

**Biochemische Charakterisierung vakuolärer Vesikel
aus *Saccharomyces cerevisiae***

Inaugural-Dissertation
Zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Inga Bellahn
aus Berlin

Köln, 2002

Berichtersteller:

Professor Dr. Reinhard Krämer

Privatdozentin Dr. Sabine Waffenschmidt

Tag der Disputation: 8. Juli 2002

Biochemical characterisation of vacuolar membrane vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*

The vacuole of *Saccharomyces cerevisiae* is known to be the major storage compartment for several solutes in the cell. In addition, the vacuole has physiological functions in coping with stress conditions. Nitrogen starvation of the cells leads to mobilisation of the vacuolar arginine pool. In this respect, a regulated flux of substrates between the vacuole and the cytoplasm is an essential process.

In the present study an *in vitro* system of vacuolar membrane vesicles was characterized with respect to purity and transport competence. Using this system we obtained information about the reversibility of aminoacid uptake carriers in the vacuolar membrane of *S. cerevisiae*. In principle this reversibility mode could have a physiological function for the regulation of the cytoplasmic aminoacid concentration. But there also may be special systems for the substrate efflux out of the vacuole. The results indicate that the mobilisation of the vacuolar arginine pool under nitrogen limited conditions does not involve a kovalent modification of the arginine uptake system.

Furthermore the proteome of the vacuolar vesicle preparation was investigated. Separation of the proteins by 2-D electrophoresis led to well focused gels with nearly 300 spots. A number of proteins were analyzed by MALDI-TOF-MS. 2-D gels of membrane vesicles isolated from cells which had been incubated under nitrogen limited conditions showed differences in the protein pattern, which were particularly due to the changed environmental conditions.

Biochemische Charakterisierung vakuolärer Vesikel aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Vakuole in *Saccharomyces cerevisiae* dient unter anderem als Speicherkompartiment für verschiedene Metabolite. Die Nutzung des vakuolären Argininpools als Stickstoffquelle unter stickstofflimitierenden Bedingungen verdeutlicht die weitere physiologische Funktion der Vakuole im Adaptionsprozess an diese Stressbedingung. Um eine Mobilisierung zu gewährleisten, muss ein regulierter bidirektionaler Fluss von Substraten über die vakuoläre Membran stattfinden.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein *in vitro* System vakuolärer Vesikel charakterisiert und für biochemische und proteinchemische Studien eingesetzt. So konnten Informationen über die Reversibilität von Transportsystemen in der vakuolären Membran von *S. cerevisiae* gewonnen werden. Es ist möglich, dass diese Reversibilität physiologisch zur Erhaltung der cytoplasmatischen Substratkonzentration genutzt wird. Für den Efflux von Metaboliten aus der Vakuole können aber auch weitere Systeme vorhanden sein. Eine kovalente Modifikation des Argininaufnahmesystems ist nach den vorliegenden Ergebnissen an der Mobilisierung des vakuolären Argininspeichers unter Stickstoffmangel nicht beteiligt. Mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese wurde das Proteinmuster der vakuolären Membran untersucht. Es konnten gut fokussierte Gele mit etwa 300 Spots hergestellt werden. Das Proteinmuster vakuolärer Vesikel stickstofflimitierter Zellen zeigte im Vergleich zu dem vakuolärer Vesikel nicht limitierter Zellen Unterschiede, die auf den Stickstoffstress zurückzuführen waren.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Die Funktion der Vakuole	1
1.2. Stickstoffmetabolismus in <i>S. cerevisiae</i>	5
1.3. Ziel der Arbeit	10
2. MATERIAL UND METHODEN	11
2.1. Chemikalien	11
2.2. Verwendete Stämme	11
2.3. Medien und Kultivierungsbedingungen	12
2.3.1. Stickstoffmangel	13
2.3.2. Polyaminstress	13
2.4. Biochemische und zellbiologische Methoden	14
2.4.1. Isolierung vakuolärer Vesikel aus <i>S. cerevisiae</i>	14
2.4.2. Proteinbestimmung nach Amidoblack	15
2.4.3. Bestimmung von Enzymaktivitäten	15
2.4.3.1. <i>Dipeptidylaminopeptidase A und B</i>	15
2.4.3.2. <i>α-Mannosidase</i>	16
2.4.3.3. <i>Cytochrom-c-Oxidase</i>	16
2.4.3.4. <i>ATPase: V-Typ, F₀F₁-Typ, P-Typ</i>	17
2.4.4. Atmungsaktivität	17
2.4.5. Energetisierung vakuolärer Vesikel	18
2.4.6. Quantifizierung von Aminosäuren	19
2.4.7. Bestimmung von Transportaktivitäten	19
2.4.8. Bestimmung von Substratefflux	20
2.4.8.1. <i>Abgrenzung des Effluxes von Counterflow</i>	20
2.4.9. Berechnung interner Substratkonzentrationen	21
2.5. Proteinchemische Methoden	21
2.5.1. Zweidimensionale Gelelektrophorese	21
2.5.1.1. <i>Probenvorbereitung</i>	21
2.5.1.2. <i>1. Dimension</i>	22
2.5.1.3. <i>2. Dimension</i>	22
2.5.2. Färbung der Gele	23
2.5.2.1. <i>Reinigung von Coomassie</i>	23
2.5.3. In-Gel-Proteolyse	23

2.6. Analytik	24
2.6.1. Präparation des MALDI-targets	24
2.6.2. Matrix Assisted Laser Desorptions Ionisation (MALDI)- Massenspektrometrie	24
2.6.3. Datenbankrecherche	25
3. ERGEBNISSE	26
3.1. Charakterisierung vakuolärer Vesikel aus <i>S. cerevisiae</i>	26
3.1.1. Güte der Präparation	26
3.1.2. Energetisierung	28
3.1.3. Quantifizierung von Aminosäuren	29
3.1.4. Transportkompetenz	29
3.1.4.1. Substratabhängigkeit	30
3.1.4.2. Proteinabhängigkeit	31
3.2. Zusammenfassung der Substrataufnahmedaten	32
3.3. Untersuchung putativer vakuolärer Polyamincarrier	34
3.3.1. Der putative Polyamintransporter Ycr023cp	34
3.3.2. Der putative Polyamintransporter Yll028wp	35
3.4. Substratefflux aus vakuolären Vesikeln	38
3.4.1. Lysinefflux	40
3.4.2. Argininefflux	45
3.4.2.1. Abhängigkeit des Arginin Effluxes von der externen ATP-Konzentration	47
3.5. Präparation nach limitierten Wachstumsbedingungen	50
3.5.1. Substrataufnahme in vakuoläre Vesikel stickstofflimitierter und nicht limitierter Zellen	52
3.6. Proteomanalyse vakuolärer Vesikel	54
3.6.1. Optimierung der Probenvorbereitung	55
3.6.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese	56
4. DISKUSSION	61
4.1. Vakuoläre Vesikel aus <i>S. cerevisiae</i>	61
4.1.1. Polyamintransport	62
4.1.2. Efflux von Aminosäuren aus vakuolären Vesikeln von <i>S. cerevisiae</i>	64
4.1.3. Vakuoläre Vesikel stickstofflimitierter Zellen	69
4.2. Proteomanalyse vakuolärer Membranen aus <i>S. cerevisiae</i>	70
5. ZUSAMMENFASSUNG	75
6. LITERATURVERZEICHNIS	77

ABKÜRZUNGEN

ACN	Acetonitril
ACMA	9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CCCP	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat
g	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kDa	Kilodalton
K _t	Michaelis-Menten Konstante
MES	2-(N-Morpholino)-Ethansulfonsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600nm
OPA	o-Phtalaldehyd
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SB3-12	<i>Sulfobetaine Surfactants</i> (Zwittergent)
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TBP	Tributylphosphin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	<i>tris buffered saline</i>
UP	<u>U</u> ltrapure: höchster Reinheitsgrad
v/v	Volumenanteil
V _{max}	Maximalgeschwindigkeit
w/v	Gewichtsanteil

1. EINLEITUNG

Die Hefe *S. cerevisiae* hat neben ihrer industriellen Nutzung im Rahmen der Fermentation eine große Bedeutung für die Grundlagenforschung erlangt. Der einzellige Eukaryot eignet sich ideal als Modellorganismus für biologische Studien, da viele fundamentale Prozesse in *S. cerevisiae* auf höhere eukaryotische Organismen übertragbar sind. Das schnelle Wachstum auf definiertem Medium erlaubt eine vollständige Kontrolle der chemischen Umgebung. Genetische Analysen, die zu einem definierten Satz von 16 Chromosomen geführt haben, lieferten eine detaillierte, vollständig sequenzierte Genomkarte mit etwa 6000 Genen (Goffeau *et al.*, 1996). Damit ist zum ersten Mal eine Annäherung an das Proteom einer eukaryotischen Zelle möglich, da unbekanntes Hefeproteine anhand von Sequenzähnlichkeiten zu charakterisierten Proteinen anderer Organismen mögliche Funktionen zugesprochen werden können. Die Fortsetzung genetischer und biochemischer Studien wird die eindeutige Zuordnung aller Gene erreichen und damit die Basis für das Verstehen des komplexen Zusammenspiels zellulärer Proteine liefern.

1.1. Die Funktion der Vakuole

Eine wichtige eukaryotischen Zellen gemeinsame Eigenschaft ist die subzelluläre Kompartimentierung. Sie ermöglicht die räumliche Trennung von Stoffwechselwegen und damit eine effektive Regulation des Metabolismus. Das größte Kompartiment in *S. cerevisiae* ist die Vakuole, sie kann bis zu 25 % des Gesamtzellvolumens einnehmen (Weisman *et al.*, 1987; Raymond *et al.*, 1990). Das intern saure Milieu und die Vielfalt hydrolytischer Enzyme sind Eigenschaften, die die Hefevakuole mit den Vakuolen anderer Pilze und einfacher eukaryotischer Zellen, den Lysosomen in Säugetierzellen und den Vakuolen bzw. Tonoplasten in Pflanzenzellen gemein hat. Die vakuoläre ATPase (Anraku *et al.*, 1989) transportiert unter Spaltung von ATP Protonen in die Vakuole. Dadurch kann ein elektrochemisches Potential von bis zu 180 mV (Kakinuma *et al.*, 1981; Bowman *et al.*, 1986) mit einem Protonengradienten von 1,7 pH Einheiten aufgebaut werden. Für *S. carlsbergensis* wurde die vakuoläre Aktivität einer Pyrophosphatase nachgewiesen, die neben der V-ATPase als Hauptenergiequelle, für die PP_i -abhängige Generierung eines elektrochemischen Potentials verantwortlich sein könnte (Lichko *et al.*, 1984). Eine solche vakuolär assoziierte Pyrophosphataseaktivität liegt in *S. cerevisiae* nicht vor, dafür aber eine massive Endo- und Exopolyphosphataseaktivität (Wiemken *et al.*, 1979). Der pH-

Gradient und das elektrische Potential über der vakuolären Membran werden durch die Interaktion membranpotentialabhängiger Kationenkanäle (Wada *et al.*, 1987), Cl⁻-Transportsysteme (Wada *et al.*, 1986) und der vakuolären ATPase reguliert (Anraku *et al.*, 1989). Aufgrund der Vielfalt an Enzymen mit hydrolytischer Aktivität wurde der Vakuole in erster Linie eine proteinabbauende Funktion zugesprochen. Verschiedene Enzyme wie die Proteinasen A und B, die Carboxypeptidasen S und Y, die Aminopeptidase I, die alkalische Phosphatase, die RNase und die α -Mannosidase wurden charakterisiert (Schwencke & de Robichon Szulmajster, 1976; Jones, 1984; Achstetter *et al.*, 1985). Der Level vieler vakuolärer Proteine variiert mit dem Wachstumsstadium und dem Nährstoffangebot der Zelle (Saheki & Holzer, 1975; Hansen *et al.*, 1977; Moehle *et al.*, 1987; Moehle & Jones, 1990), wobei viele in Prozesse der generellen Proteolyse, des Abbaus und der Wiederverwertung kleiner Peptide sowie dem durch Sporulation hervorgerufenen Proteinabbau beteiligt sind. (Jones, 1984; Achstetter *et al.*, 1985; Teichert *et al.*, 1989). Mit dem Transport von Ionen trägt die Vakuole zu der Erhaltung der Ionenhomöostase bei. Potentiell toxische Ionen wie Co²⁺ und Pb²⁺ werden aus dem Cytosol entfernt und physiologisch nutzbare wie Ca²⁺, Mg²⁺ und Zn²⁺ werden in cytosolisch optimaler Konzentration gehalten. Der pH-Wert der Vakuole, der für die Aufrechterhaltung vieler zellulärer Funktionen notwendig ist, variiert in *S. cerevisiae* mit dem Wachstumsstadium (Greenfield *et al.*, 1987). Eine Beteiligung der Vakuole an der zellulären pH- und Osmoregulation der Zelle wird vermutet, weil Mutanten mit gestörter vakuolärer Funktion eine erhöhte Sensitivität gegenüber einem sich ändernden pH im Medium zeigten (Banta *et al.*, 1988). Diese Mutanten wiesen auch eine erhöhte Osmosensitivität auf, was eine zusätzliche Funktion der Vakuole in der Osmoregulation begründete. Direkte Beweise über die Beteiligung der Vakuole an der pH- und Osmoregulation der Zelle bestehen aber bisher nicht. Die Anreicherung und Speicherung von Metaboliten in der Vakuole erlaubt es, dass deren cytoplasmatische Konzentration in einem physiologischen Level gehalten werden und so eine Regulation des Stoffwechsels durch die Verfügbarkeit von Substraten erfolgen kann (Klionsky *et al.*, 1990). Außerdem kann die Zelle auf die gespeicherten Metabolite zurückgreifen, wenn sie unter nährstofflimitierende Bedingungen gerät (Kitamoto *et al.*, 1988, Messenguy *et al.*, 2000). Für viele Substanzen, die in der Vakuole akkumuliert werden, wurde ein aktiver Import nachgewiesen und die entsprechenden Systeme biochemisch charakterisiert. Diese umfassen Transporter für Protonen (Kakinuma *et al.*, 1981), Ca²⁺ (Ohsumi *et al.*, 1983; Cunningham & Fink, 1994), Cl⁻ (Wada *et al.*, 1992), K⁺ und Na⁺ (Wada *et al.*, 1987), Glutathion-S-Konjugate (Li *et al.*, 1996), S-Adenosylmethionin (Schwencke & De Robichon Szulmajster, 1976), Purine (Nagy, 1979), Phosphat

(Booth & Guidotti, 1997) und Aminosäuren (Ohsumi & Anraku, 1981; Sato *et al.*, 1984). Für letztere wurden sieben unabhängige, sekundär aktive Transportsysteme postuliert, die durch einen H^+ /AS-Antiport Mechanismus den von der V-ATPase generierten elektrochemischen Gradienten nutzen (Sato *et al.*, 1984). Da diese nicht mit Valinomycin inhibiert werden können, scheint das elektrische Potential bei diesen Transportprozessen keine maßgebliche Rolle zu spielen (Ohsumi & Anraku, 1981; Ohsumi & Anraku, 1983). Zwei Charakteristika unterscheiden diese Carrier von Aminosäuretransportsystemen cytoplasmatischer Membranen: die Affinität der vakuolären Systeme ist um zwei Größenordnungen geringer (Crabeel & Grenson, 1970; Cooper, 1982) und das pH-Optimum der vakuolären Carrier ist im neutralen Bereich, während das cytoplasmatischer im sauren pH-Bereich liegt (Cooper, 1982). Die Anreicherung insbesondere der basischen Aminosäuren in der Vakuole um das 5 bis 40fache (Ohsumi & Anraku, 1981; Sato *et al.*, 1984) führt zu zwei getrennten Pools, wobei der große vakuoläre einen geringen und der kleine cytosolische Pool einen hohen metabolischen Umsatz hat. Die Aminosäuren Arginin, Histidin, Lysin und Ornithin liegen zu über 90 % in der Vakuole vor (Wiemken *et al.*, 1974; Messenguy *et al.*, 1980). Die homöostatische Kontrolle der cytoplasmatischen Konzentration von Aminosäuren und Ionen ist extrem wichtig, weil trotz ihrer Notwendigkeit für physiologische Prozesse ein Überschuss dieser Substanzen für die Zelle toxisch sein kann. Über den Mechanismus, mit dem die Zelle die Retention der Aminosäuren und die Erhaltung der Elektroneutralität in der Vakuole reguliert, ist nur wenig bekannt. Um die osmotische Aktivität der Kationen zu senken, wurde eine mögliche Funktion von vakuolärem Polyphosphat in Erwägung gezogen, das als Kationenfalle wirken und mit den basischen Aminosäuren Komplexe formen könnte (Dürr *et al.*, 1979). Der Nachweis dieser Komplexe *in vitro* (Miller, 1984) und die stöchiometrische Korrelation zwischen den akkumulierten Mengen von Arginin und Polyphosphat in der Vakuole (Dürr *et al.*, 1979) stützen diese Vermutung. Die in *S. cerevisiae* unabhängige Mobilisierung des Arginin- und Polyphosphat-Pools aus der Vakuole bedingt aber die Notwendigkeit eines weiteren bzw. anderen Mechanismus. So wurde vermutet, dass die vakuoläre Membran auch für hochangereicherte Kationen impermeabel ist (Cramer & Davis, 1984). Nach der Aufnahme durch einen aktiven Transportprozess würden die Kationen ohne weiteren Energieaufwand in der Vakuole bleiben, bis ein cytoplasmatischer Bedarf einen Efflux aus der Vakuole hervorruft. In *Neurospora crassa*, wie auch in *S. cerevisiae* wird ein solcher Efflux von Arginin aus der Vakuole in das Cytosol durch Stickstoffmangel hervorgerufen. Insbesondere Untersuchungen des Arginins in *S. cerevisiae* (Kitamoto *et al.*, 1988) und *N. crassa* (Legerton & Weiss, 1984) zeigen, dass der vakuoläre Speicher dieser Aminosäure

unter stickstofflimitierenden Bedingungen als Stickstoffquelle genutzt wird (Kitamoto *et al.*, 1988, Messenguy *et al.*, 2000). Das vakuoläre Arginin wird in *S. cerevisiae* nach dem Export aus der Vakuole in das Cytosol zu Prolin metabolisiert, das in die Mitochondrien transportiert und dort zu Glutamat verstoffwechselt wird. Glutamat kann als Stickstoffdonor für alle zellulären Komponenten dienen (Magasanik, 1992). Nur wenige Kenntnisse liegen aber darüber vor, wie die Zelle diesen vakuolären Speicher mobilisiert. Als Mechanismus wird in *Penicillium cyclopium* die Equilibrierung zwischen einer aktiven energieabhängigen Aufnahme und einem passiven Efflux vorgeschlagen (Roos *et al.*, 1997). Es wird für *P. cyclopium* vermutet, dass in nährstoffreichem Medium der Efflux von Aminosäuren aus der Vakuole in das Cytosol ein ständiger Prozess ist, der mit der aktiven Wiederaufnahme in die Vakuole kompensiert wird, um die cytosolische Aminosäurekonzentration niedrig zu halten (Roos *et al.*, 1997). Hier wurde eine sigmoidale Abhängigkeit des Effluxes von der intravakuolären Aminosäurekonzentration sowie stimulierende und inhibierende Effekte durch die extravakuoläre ATP-Konzentration beobachtet.

Auf molekularbiologischer Ebene sind bisher nur wenige vakuoläre Aminosäuretransporter charakterisiert worden. Durch Homologiesuche des vesikulären GABA-Glycin Transporters neuronaler Zellen aus Rattenhirn mit dem Hefegenom identifizierte die Arbeitsgruppe um Russnak *et al.* (2001) sieben Gene, die mit AVT (*aminoacid vacuolar transport*) 1-7 benannt wurden. Avt1p wird eine Funktion in der Aufnahme großer neutraler Aminosäuren zugesprochen, Avt3p, Avt4p und Avt6p sind in den Efflux von Aminosäuren aus der Vakuole in das Cytosol involviert. Avt3p und Avt4p transportieren Tyrosin und andere große neutrale Aminosäuren, während Russnak *et al.* (2001) für Avt6p eine Funktion als vakuolären Exporter für saure Aminosäuren vorschlägt, der im Symport mit einem Proton das durch die V-ATPase generierte elektrochemische Potential nutzt. Auch die den Avt-Proteinen verwandten Aminosäurecarrier der Aminosäure/Auxin-Permease-Familie in der Plasmamembran von Pflanzen (Young *et al.*, 1999), sowie die nicht verwandten Aminosäure-Permeasen der MFS (*major facilitator superfamily*)-Familie in Bakterien und Hefen (Andre, 1995) nutzen diesen Modus. Avt2p, Avt5p und Avt7p konnte keine Funktion als vakuoläre Aminosäuretransporter zugeordnet werden. Nach Studien Hämagglutinin-gekoppelter Genprodukte von AVT2 und AVT7 wurde Avt7p in der Vakuole und in der Plasmamembran lokalisiert, während Avt2p wahrscheinlich im Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist.

1.2. Stickstoffmetabolismus in *S. cerevisiae*

Die Zelle agiert in allen Aspekten der Physiologie und des Metabolismus als eine Einheit, in der sämtliche Stoffwechselwege betroffen sind. Neue Daten über den Effekt einer Kohlenstofflimitation auf die Expression von Genen, die unter Stickstoffmangel im Rahmen der *NCR* (*nitrogen catabolite repression*) hochreguliert werden (Bertram *et al.*, 2001), machen diese Tatsache deutlich. Daher dient die Betrachtung einzelner Stoffwechselwege der Übersicht, ist aber immer nur ein Ausschnitt aus einem komplexen, übergreifenden Metabolismus. In *S. cerevisiae* muss jedes Molekül, das als Stickstoffdonor dienen soll, in Glutamat oder Glutamin umgewandelt werden (Cooper, 1982; Magasanik, 1992; ter Schure *et al.*, 1999). Daher werden diese beiden Aminosäuren als Knotenpunkte des Stickstoffmetabolismus angesehen (*central nitrogen metabolism, CNM*), von denen aus alle weiteren Komponenten, die Stickstoff enthalten, synthetisiert werden können (Wiame *et al.*, 1985; Cooper, 1982; Magasanik, 1992).

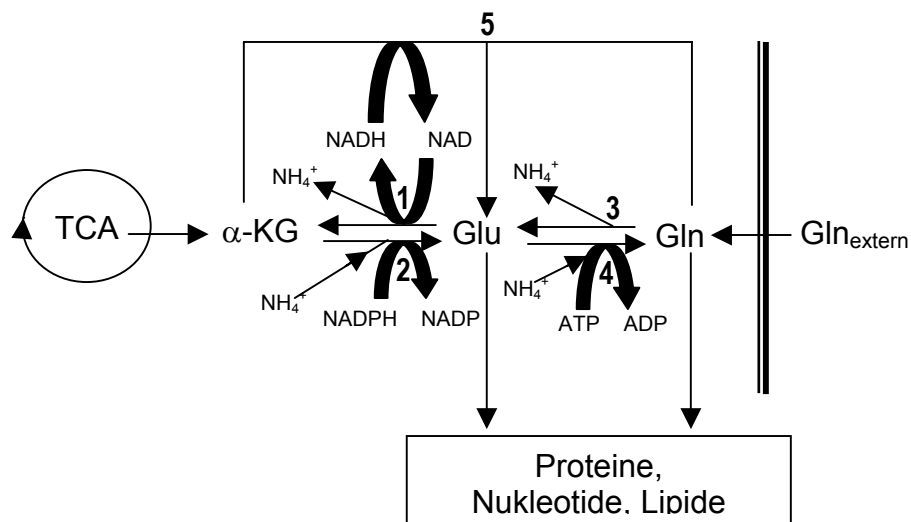


Abbildung 1.1 *central nitrogen metabolism (CNM) in S. cerevisiae*: α -KG: α -Ketoglutarat; Glu: Glutamat; Gln: Glutamin; 1: NAD-GDH (NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase); 2: NADPH-GDH (NADPH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase); 3: GDA (Glutamin-Deaminase); 4: GS (Glutamin-Synthetase); 5: GOGAT (Glutamat-Synthase). Nach ter Schure *et al.*, 1995).

Glutamat und Glutamin können beide mit Ammonium als Stickstoffdonor synthetisiert werden: die NADPH abhängige Glutamat-Dehydrogenase (NADPH-GDH) wandelt Ammonium und α -Ketoglutarat in Glutamat um, die Glutamin-Synthetase (GS) metabolisiert Glutamat und Ammonium unter der Aufwendung von einem ATP-Molekül zu Glutamin. Die NADPH-GDH wird durch *GDH1* und ein Isoenzym durch *GDH3* codiert, sie ist das wichtigste Enzym der Glutamatsynthese in *S. cerevisiae* (Roon *et al.*, 1974; Holmes *et al.*, 1989; Holmes *et al.*, 1991; ter Schure *et al.*, 1995). Bei Wachstum auf Glutamin kann Glutamat auf drei Wegen synthetisiert werden: über die NADH abhängige Glutamat Synthase (GOGAT), die Glutaminase (GDA) und die NADPH-abhängige Glutamat-Dehydrogenase. Der oxidative Abbau von Glutamat in α -Ketoglutarat und Ammonium wird durch die NAD-abhängige Glutamat-Dehydrogenase (NAD-GDH) katalysiert und ist bei der Verstoffwechselung von Aminosäuren aktiv. Während die α -Ketoglutarat Synthese im Tricarbonensäurezyklus in den Mitochondrien stattfindet, sind beide Glutamat-Dehydrogenasen im Cytosol lokalisiert. Vorwiegend gelangen Stickstoffquellen über Plasmamembran-ständige Permeasen in die Zelle. In Abhängigkeit davon, wie schnell die Zelle auf ihnen wachsen kann werden sie in gute (z.B. Ammonium, Glutamin, Asparagin) und schlechte (z.B. Prolin, Harnstoff) Quellen eingeteilt. Sie stehen im Zusammenhang mit der Regulation des zentralen Stickstoffmetabolismus, die hauptsächlich auf transkriptioneller, aber auch auf posttranslationaler Ebene erfolgt. Verschiedene Permeasen mit niedriger Kapazität wie die Histidin Permease *Hyp1p*, die Lysin Permease *Lyp1p* und die Permease für basische Aminosäuren *Can1p*, die konstitutiv exprimiert werden (Tanaka & Fink, 1985;

Vandenbol *et al.*, 1989; Jauniaux & Grenson, 1990; Sychrova & Chevallier, 1993), dienen als Hauptaufnahmesysteme bei Wachstum auf guten Stickstoffquellen. Für Ammonium sind drei Permeasen bekannt, die an der Aufnahme beteiligt sind, Mep1p, Mep2p und Mep3p (Marini *et al.*, 1997), wobei ab einer Konzentration von 20 mM Ammonium im Medium für dieses Substrat keine Permease zum Import mehr notwendig ist (Marini *et al.*, 1997). Die generelle Aminosäure Permease Gap1p und die für Prolin spezifische Permease Put4p sind bei der Anwesenheit guter Stickstoffquellen reprimiert (Jauniaux *et al.*, 1987; Jauniaux & Grenson, 1990). Ihre Expression bei Wachstum auf ausschließlich schlechten Stickstoffquellen, sowie die Expression der Prolin abbauenden Enzyme kann infolge einer erhöhten intrazellulären Prolinkonzentration induziert werden. Solange die Zelle gute Stickstoffquellen zur Verfügung hat, werden die Enzyme, die für die Metabolisierung schlechter Stickstoffquellen benötigt werden reprimiert. Bei diesem komplexen regulatorischen Mechanismus, der als *nitrogen catabolite repression (NCR)* bezeichnet wird und die Zelle dazu befähigt, die beste Stickstoffquelle zu selektionieren, herrscht die transkriptionelle Kontrolle vor (Van Riel *et al.*, 1998; ter Schure *et al.*, 1999). Mindestens fünf Schlüsselproteine, sind an der Regulation der *NCR* auf dieser Ebene beteiligt. Zwei positive Transkriptionsfaktoren, Gln3p und Gat1p/Nil1p und zwei negative, Dal80p/Uga43p und Deh1p/Gzf3p/Nil2p/Yjl110cp sowie das regulatorische Protein Ure2p. Die Transkriptionsfaktoren erkennen UAS_{NTR}-Stellen in der Promotorregion der Zielgene (Rai *et al.*, 1989; Cooper *et al.*, 1989; Cunningham & Cooper, 1991; Coffman *et al.*, 1994). Diese stickstoffregulierte Aktivierungssequenz besteht aus zwei separaten Dodecanukleotiden, die die Sequenz GAT(T/A)A in ihrem Zentrum enthalten (Rai *et al.*, 1989; Bysani *et al.*, 1991). Der genaue Signalweg für die Regulation der Transkription der *NCR*-Gene ist nicht klar. Bei Vorliegen von Glutamin oder Ammonium wird Ure2p aktiviert, ein Glutathion S-Transferase homologes Protein, das wiederum den Transkriptionsaktivator der *NCR*-Gene Gln3p inaktiviert (Courchesne & Magasanik, 1988; Coschigano & Magasanik, 1991; Minehart & Magasanik, 1991; Blinder & Magasanik, 1995). Die erniedrigte Aktivität begründet dann unter anderen die verminderte Transkription von *GAP1* und *PUT4*. Für die Inaktivierung von Gln3p wurde eine Modifikation von Thiolgruppen (Coschigano & Magasanik, 1991; Magasanik, 1992) oder eine physische Interaktion von Ure2p und Gln3p vorgeschlagen, die Gln3p an der Aktivierung der Transkription hindert (Blinder *et al.*, 1996). Dal80p ist ein transkriptioneller Repressor, der mit den transkriptionellen Aktivatoren Gln3p und Nil1p um die Bindung an der regulatorischen Sequenz der *DAL*- und *GDH1,3*-Gene konkurriert. Die *DAL*-Proteine sind für den Abbau von Allophanat notwendig, das in dem ersten Schritt des Harnstoffabbaus entsteht. Bei guten

Stickstoffbedingungen wird die Expression der *DAL*-Gene durch Dal80p verhindert. Auf Proteinebene nutzt die Zelle auch posttranslationale Modifikationen, um eine Adaption an verschiedene Stickstoffquellen zu erreichen. Eine schnelle Aktivierung bzw. Inaktivierung der Permeasen Gap1p und Put4p erfolgt durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung. Der Inaktivierung dieser Proteine bei guter Stickstoffversorgung folgt nach Ubiquitinierung der Abbau in der Vakuole (Wiame *et al.*, 1985; Stanbrough & Magasanik, 1995). Die Zelle besitzt verschiedene Mechanismen zur Wahrnehmung von Stickstoffquellen. Es wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Ammoniumkonzentration zu einem veränderten Expressionsmuster der *NCR*-sensitiven Gene, einschließlich *GAP1* und *PUT4* führt (Magasanik, 1988; ter Schure *et al.*, 1995; ter Schure *et al.*, 1998). Mep2p wird eine Funktion als Ammoniumsensors zugesprochen (Lorenz & Heitman, 1998). Als Sensor extrazellulärer Aminosäuren, die potentielle Stickstoffquellen darstellen, ist der sogenannte SPS-Komplex bekannt. Ssy1p, ein Mitglied der Aminosäure Permease Familie (Jorgensen *et al.*, 1998), Ptr3p, ein Protein unbekannter Funktion, das eine geringe Sequenzhomologie zu den Aminosäure/Auxin-Permeasen und dem Transkriptionsfaktor Gcn4p aufweist (Klasson *et al.*, 1999), sowie Ssy5p, ein Protein unbekannter Funktion und ohne signifikante Sequenzähnlichkeit zu anderen bekannten Proteinen (Jorgensen *et al.*, 1998), sind an der Bildung dieses Komplexes beteiligt. Die Expression der Aminosäure-Permeasen des Clusters I (Einteilung der Gene der Aminosäure-Permeasen in Cluster nach Nelissen *et al.*, 1997) werden durch Aminosäuren und in Abhängigkeit des Sensors induziert, *GAP1* wird in Abhängigkeit des SDS-Komplexes reprimiert. Bei Mangel einzelner Aminosäuren wird infolge der generellen Aminosäurekontrolle (Hinnebusch, 1988) die Dereprimierung verschiedener Gene, die für Aminosäure-synthetisierende Enzyme codieren, induziert. Eine Komponente dieses Weges ist der Transkriptionsaktivator Gcn4p. Dieser Transkriptionsaktivator induziert auch die Expression der Gene des zentralen Stickstoffmetabolismus *GLN1* (GS: Glutamin-Synthetase) und *GLT1* (GOGAT: Glutamat Synthase). Bei Stickstofflimitation muss die Zelle Glutamat aus vorhandenen Stickstoffquellen synthetisieren. In den unter Hungerbedingungen einsetzenden autophagischen Prozessen werden cytosolische Proteine in doppelmembranumhüllte Vesikel abgesondert und in die Vakuole transportiert. Während die äußere Membran mit der vakuolären fusioniert, wird der mit einer einfachen Membran die cytosolische Fracht umschließende *autophagic body* in das vakuoläre Lumen aufgenommen (Klionsky, 2000). Die Steuerung dieses Transportweges erfolgt durch Komponenten, die teilweise auch in dem konstitutiven Transport cytoplasmatischer Protein über den *Cvt (cytoplasm to vacuole)*-Weg involviert sind. In der Vakuole werden die Proteine des Autophagosoms in einem Proteinase B-

abhängigen Prozess abgebaut (Klionsky *et al.*, 1990) und so Aminosäuren für die Wiederverwertung bereitgestellt. Gleichzeitig wird der vakuoläre Argininpool mobilisiert und über Prolin zu Glutamat metabolisiert (Kitamoto *et al.*, 1988; Messenguy *et al.*, 2000). Infolge der ansteigenden Prolinkonzentration wird die Expression der Prolin-abbauenden Enzyme induziert und der Transkriptionsaktivator Gcn4p führt unter anderem zur erhöhten Expression der Glutamin-Synthase und der Glutamat-Synthase.

1.3. Ziel der Arbeit

Die Funktion der Vakuole in *S. cerevisiae* als Speicherorganell und die gezeigte Mobilisierung von Aminosäuren unter Stickstoffmangel setzt kontrollierte bidirektionale Transportprozesse über die vakuoläre Membran voraus. In den letzten Jahren wurden anhand von *in vitro* Studien viele vakuoläre Aufnahmesysteme in *S. cerevisiae* biochemisch charakterisiert, während über den Efflux von Substraten aus der Vakuole in das Cytoplasma kaum Kenntnisse vorhanden sind. Rekombinante Stämme von *S. cerevisiae*, die Störungen in der vakuolären Speicherung von Metaboliten aufwiesen und dadurch einen Wachstumsphänotyp trotz Überschusses an Substrat zeigten, sollten Hinweise darauf liefern (Klionsky, 1990). Da aber der Phänotyp durch verschiedene Ursachen wie gestörter Transport über die vakuoläre Membran, Verlust der Speicherfähigkeit oder Verlust der regulatorischen Kontrolle über die Homöostase, hervorgerufen sein könnte, ist die gezielte Untersuchung des Exports von Substraten aus der Vakuole anhand von Mutanten schwierig.

In dieser Arbeit sollten *in vitro*-Systeme transportkompetenter vakuolärer Vesikel nach nicht limitierten und stickstofflimitierten Wachstumsbedingungen charakterisiert und anschließend mit diesen Systemen neue Daten über den Im- und Export von Substraten gewonnen werden. In einem globalen Ansatz sollte das Proteom der vakuolären Membran im Adaptionsprozess an nährstofflimitierende Bedingungen beobachtet werden. Dieses Projekt erforderte eine Optimierung der entsprechenden Techniken.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham International, Buckinghamshire, GB:

- L-[U-¹⁴C] Phenylalanin Monohydrochlorid, 16,6 GBq/mmol
- L-[U-¹⁴C] Lysin Monohydrochlorid; 12,2 GBq/mmol
- L-[U-¹⁴C] Arginin Monohydrochlorid, 11GBq/mmol
- L-[2,3,4,5-³H] Arginin Monohydrochlorid; 2,11 TBq/mmol

Millipore; Eschborn, D

- Glasfaserfilter, Typ F, Porengröße 0,45 µm
- C₁₈ -Zip Tips

Pharmacia Biotech, Freiburg, D

- Harnstoff (UP)
- Thioharnstoff (UP)
- DTT (UP)

Alle weiteren, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma, (Deisenhofen, D), Merck (Darmstadt, D) oder Boehringer (Mannheim, D) in p.A. Qualität bezogen.

2.2 Verwendete Stämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 2.1 aufgelistet.

Tabelle 2.1 Verwendete Stämme

Stamm	relevanter Geno/ Phänotyp	Herkunft/ Referenz
23344c	Wildtyp, Mata <i>ura3</i>	B. Andre
WF7	Mata <i>YCR023c</i> -HA kanMX <i>ura3</i>	W. Frommer
WF1	Mata <i>Ycr023c::lacZ</i> kanMX <i>ura3</i>	W. Frommer
RK25	Mata <i>TPO1</i> -HA kanMX <i>ura3</i>	M. Albertsen
RK26	Mata <i>tpo1::lacZ</i> kanMX <i>ura3</i>	M. Albertsen

2.3 Medien und Kultivierungsbedingungen

YPD- Medium

- 2% Glukose
- 2% Pepton
- 1% Hefeextrakt

CBS- Medium (modifiziert nach Verduyn *et al.*, 1992)

CBS-Medium:

- 0,1 M Phtalat/ KOH pH 5,5
- 2 % Glukose
- 0,5 % Ammoniumsulfat
- 0,3 % Kaliumdihydrogenphosphat
- 0,05 % Magnesiumsulfat
- 0,002 % Uracil
- 1x Vitamine aus 1000facher Stammlösung
- 1x Spurenelemente aus 1000facher Stammlösung

1000x Vitamine:

- 0,005 % d-biotin
- 0,1 % Ca D(+)Panthothenat
- 0,1 % Nicotinsäure
- 2,5 % Myo-Inositol
- 0,1 % Thiamin-Hydrochlorid
- 0,1 % Pyridoxol-Hydrochlorid
- 0,02 % Aminobenzoessäure

Das Biotin wurde in 10 ml 0,1 M NaOH gelöst. Mit Wasser wurde die Lösung auf 0,75 l aufgefüllt und mit 1 M HCl auf pH 6,5 eingestellt. Alle Komponenten wurden nacheinander gelöst und nach jedem Schritt der pH erneut auf 6,5 eingestellt. Nach dem Lösen aller Bestandteile wurde mit Wasser auf ein Liter aufgefüllt, die Lösung sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

1000x Spurenelemente:

- 1,5 % EDTA
- 0,45 % Zinksulfat Heptahydrat
- 0,1 % Maganchlorid Tetrahydrat
- 0,03 % Kobalt (2)-chlorid Hexahydrat
- 0,03 % Kupfer (2)-sulfat Pentahydrat
- 0,04 % Dinatrium Molybdän Dihydrat
- 0,45 % Kalziumchlorid Dihydrat
- 0,3 % Eisensulfat Heptahydrat
- 0,1 % Borsäure
- 0,01 % Kaliumiodid

EDTA und Zinksulfat wurden in 0,75 l Wasser gelöst und der pH mit 1 M NaOH auf 6,0 eingestellt. Nacheinander wurden die übrigen Komponenten gelöst und im folgenden der pH mit 1 M HCl auf 4,0 eingestellt. Die Lösung wurde mit Wasser auf 1 l aufgefüllt und in Aliquots autoklaviert. Die Lösung wurde im Dunkeln bei Raumtemperatur gelagert.

25 ml Medium wurden mit einigen Hefezellkulturen beimpft und bei 30°C, 130 rpm bis zum Erreichen der stationären Phase angezogen. 500ml Medium in 2-l Schikanekolben wurden von der Vorkultur angeimpft. Die Ernte der Zellen erfolgte bei OD₆₀₀ 2-3, nachdem die Zellen mindestens vier Teilungszyklen durchgemacht hatten.

2.3.1 Stickstoffmangel

CBS-N: 5 mM Harnstoff (sterilfiltriert) statt 0,5% Ammoniumsulfat

Für die Isolierung vakuolärer Vesikel aus unter Mangelbedingungen gewachsenen Zellen wurden diese zu einer OD₆₀₀ von 2-2,5 in definiertem Vollmedium (CBS) angezogen. Die Zellen wurden geerntet und einmal in gleichem Volumen Mangelmedium (CBS-N) gewaschen. Die Zellen wurden bei gleicher OD in Mangelmedium aufgenommen und die gewünschte Zeit bei 30°C und 130 rpm inkubiert.

2.3.2 Polyaminstress

CBS+ Polyamine: CBS plus 10 mM Putrescin, 1 mM Spermin und 1 mM Spermidin

Zur Induktion von Proteinen, die im Rahmen des Polyaminmetabolismus exprimiert werden, wurden bei entsprechenden Experimenten 10 mM Putrescin, 1 mM Spermin und 1 mM Spermidin dem Medium zugesetzt. Da Polyamine leicht an die Zellwand adsorbieren wurde nach der Ernte dreimal in Kultivierungsvolumen mit Wasser gewaschen.

2.4 Biochemische und zellbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung vakuolärer Vesikel aus *S. cerevisiae* (mod. nach Roberts *et al.*, 1991)

Die Zellen wurden in Schüttelkolben bis OD₆₀₀ 2-3 angezogen. Nach der Ernte (4000*g, 3',RT) wurde einmal mit Wasser gewaschen. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes wurden die Zellen in 0,1 M Tris-SO₄ pH 9,4; 10 mM DTT (0,5 g FW/ml) aufgenommen und 10' bei 30°C im Wasserbad bei 120 rpm inkubiert. Nach Zentrifugation bei 2000*g für 5' wurden die Zellen einmal mit SOB gewaschen und unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Das Pellet wurde in SOB aufgenommen (0,15 g FW/ml). Nach Zugabe von *lysing enzymes* (Boehringer) (1 mg lysing enzymes/ 5*10⁸ Zellen) wurde die Zellsuspension 30' bei 30°C im Wasserbad bei 120 rpm inkubiert.

Die Zellen wurden bei 1500*g, 8' abzentrifugiert und zweimal mit SOB gewaschen. Das Pellet wurde in Puffer A zu einer Dichte von 4*10¹⁰ Zellen/ 25ml Lösung aufgenommen und die Protoplasten durch diesen hypoosmotischen Schock aufgeschlossen. Die Suspension wurde zügig mit Proteaseinhibitoren in folgenden Konzentrationen versetzt: Leupeptin 1,5 µg/ml, Pepstatin 1,5 µg/ml, E64 1 µg/ml, PMSF 175 mM. Die Suspension wurde mit Hilfe eines Dounce Homogenizers bei 5-10 Stößen homogenisiert. Je 25 ml der Suspension wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und mit 13 ml Puffer A vorsichtig überschichtet. Nach Zentrifugation bei 60000*g 1h und 15 Minuten wurde die weiße flotierende Schicht abgenommen und in einem Endvolumen von 6 ml in Puffer A in einem 12-ml Polyallomer Zentrifugenröhrchen resuspendiert, homogenisiert und mit 6 ml Puffer B überschichtet. Nach Zentrifugation bei 60000*g 1h 15 Minuten wurde die flotierende Schicht separat von der darunter liegenden Flüssigkeit abgenommen und in 1-2 ml 2x Puffer C resuspendiert. Nach Zusetzen des gleichen Volumens von Puffer einfacher Konzentration wurde EDTA-freier Proteaseinhibitor (Boehringer) zugegeben, die Suspension aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die vakuolären Vesikel wurden bei -80°C gelagert und nur einmalig zur sofortigen Verwendung aufgetaut.

SOB: 1,2 M Sorbitol in 5 mM MES-Tris pH 6,9

Puffer A : 12 % Ficoll; 10 mM MES-Tris pH 6,9; 0,1 mM MgCl₂

Puffer B : 8% Ficoll ; 10 mM MES-Tris pH 6,9; 0,5 mM MgCl₂

2x Puffer C : 0,1 M MES-Tris pH 6,9 ; 0,1 M KCl ; 0,02 mM MgCl₂

2.4.2 Proteinbestimmung nach der Amidoblack-Methode

Da diese Methode nicht gegen im Ansatz befindliches Lipid anfällig ist, ist sie geeignet zur Proteinbestimmung der vakuolären Vesikel.

Die Proben wurden mit Wasser auf ein Volumen von 225 µl aufgefüllt. Es wurden 30 µl 1 M Tris-HCl pH 4,7, 2 % SDS und 50 µl 90 % TCA zugegeben, gemischt und 4-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Filter (HA-Filter, Millipore Corporation, Bedford, England, Porengröße 0,45 µm, Ø 5-6 cm) wurde mit Wasser befeuchtet und dann auf ein Absaugvorrichtung gelegt. Die Proben wurden tropfenweise auf vorher markierte Punkte pipettiert und mit 200 µl 6 % TCA nachgespült, bevor der gesamte Filter mit 1-2 ml 6 % TCA gespült wurde. Der Filter wurde in einer Petrischale 10 Minuten in 0,25 % Amidoblack, 45 % Methanol, 10 % Essigsäure, gefärbt und anschließend mit Wasser gespült. Die Entfärbung des Filters erfolgte in 90 % Methanol, 2 % Essigsäure. Die gefärbten Punkte des Filters wurden ausgeschnitten, in Reaktionsgefäße überführt und in 1 ml 25 mM NaOH, 50 µM EDTA, 50 % Ethanol vollständig entfärbt. Anhand der photometrischen Bestimmung der Extinktionswerte bei 630 nm wurde die Proteinkonzentration ausgerechnet.

2.4.3 Bestimmung von Enzymaktivitäten

Die spezifische Aktivität und die Gesamtaktivität von Leitenzymen verschiedener Organellen wurden in Lysat (Protoplasten in 12% Ficoll) und in der vakuolären Präparation bestimmt. Die Berechnung der Enzymaktivitäten wurden nach folgender Gleichung berechnet:

$$\text{Enzymaktivität [nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}] = \frac{\Delta \cdot E \cdot V_t}{\varepsilon \cdot t \cdot P \cdot d}$$

ΔE :	Extinktion (nm)	t:	Zeit (min)
V_t :	Gesamtvolumen (cm ³)	P:	Proteinmenge (mg)
ε :	Extinktionskoeffizient (µmol ⁻¹ cm ²)	d:	Schichtdicke der Küvette (cm)

2.4.3.1 Dipeptidylaminopeptidase (DPAP) A und B (Roberts et al., 1991)

Die Amino-peptidase A ist ein Leitenzym des Golgi Apparates. Die Amino-peptidase B ist ein integrales Membranprotein der Vakuole. Unterschieden werden die Aktivitäten der beiden Enzyme auf Basis der Temperatursensitivität der Amino-peptidase B. Alle Proben wurden

doppelt angesetzt und die Hälfte vor Start der Reaktion 15' bei 60°C und anschließend 5' auf Eis inkubiert.

Das Probenvolumen von 200 µl beinhaltete 0,5 % Brij 58, 20-100µl Vesikelprotein und Wasser. Nach Zugabe von 250 µl 0,1 M HEPES-Tris pH 7 wurde die Reaktion durch Zufügen des Substrats, 50 µl 3 mM Ala-Pro-p-Nitroanilid (in 25 %Methanol) gestartet und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach Zusatz von 500 µl 5 % ZnSO₄ und 100 µl gesättigter Ba(OH)₂-Lösung, pH 12,5 wurde 5' bei 15000*g zentrifugiert. Die Extinktion wurde bei 405 nm bestimmt und die Enzymaktivitäten über den Extinktionskoeffizienten von 18,4 [µmol⁻¹ cm²] ausgerechnet. Die Aktivität der DPAP B entsprach der Differenz der Gesamtaktivität und der Aktivität der bei 60°C inkubierten Proben.

2.4.3.2 *α-Mannosidase (Roberts et al., 1991)*

Die *α*-Mannosidase ist ein peripheres Membranprotein der Vakuole. Die Aktivität wurde anhand der Umsetzung von p-Nitrophenyl-*α*-D-Mannopyranosid bestimmt. Für den Ansatz wurden 0,6 ml HEPES-NaOH pH 6,5, 2 µl Triton X-100 und 25-200 µl Vesikelsuspension zusammenpipettiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml 4 mM p-Nitrophenyl-*α*-D-Mannopyranosid gestartet. Der Ansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert und durch Zusetzen von 1 ml 0,5 M Glycin-Na₂CO₃ pH10 gestoppt. Bei 400 nm wurde die Extinktion bestimmt und über den Extinktionskoeffizienten von 18,4 [µmol⁻¹ cm²] die Enzymaktivität ausgerechnet.

2.4.3.3 *Cytochrom c-Oxidase*

Die Cytochrom c-Oxidase wurde in einem kontinuierlichem Assay als Leitenzym der Mitochondrien gemessen. Die Oxidation von Cytochrom c wurde bei 550 nm photometrisch verfolgt. Die Negativkontrolle beruhte auf der spezifischen Hemmbarkeit der Cytochrom c-Oxidase durch KCN.

Der Ansatz enthielt 950 µl 0,1mM KP_i pH 7,2, 50 µl reduziertes Cytochrom c 1 mM (die Reduktion von Cytochrom c erfolgte mit einigen Körnchen Natriumdithionit) und 100µl Vesikelprotein. Die Hemmung der Reaktion erfolgte 20 µl mit 1 M KCN.

Über den Extinktionskoeffizienten von 21,4 [µmol⁻¹ cm²] wurden die spezifische und die Gesamtaktivität berechnet.

2.4.3.4 ATPase: V-Typ, F₀F₁-Typ, P-Typ

Der ATPase Assay erfolgte auf Basis des Nachweises von ATP durch das Luciferin/Luciferase System.



Da der Luciferin/Luciferase-Rohextrakt keine zeitlich konstante Lichtemission liefert, im Gegensatz zu hochgereinigten Extrakten, wurde statt der Emissionsrate die Lichtemission der ersten 20 Sekunden nach dem Start der Reaktion bestimmt. Die Proportionalität der Messwerte zum ATP-Gehalt wurde anhand von Eichwerten kontrolliert.

Zur Unterscheidung der verschiedenen ATPasen wurden Inhibitoren verwendet. Diese wurden auch den entsprechenden Eichungen zugesetzt, um deren Einfluss auf die Aktivität der Luciferase zu berücksichtigen.

Tabelle 2.2 spezifische ATPase-Inhibitoren und die jeweilige Arbeitskonzentration (Serrano, 1988)

Inhibitor	Arbeitskonzentration	ATPase
NaN ₃	10 mM	F ₀ F ₁ -Typ
Na ₃ VO ₄	0,1 mM	P-Typ
Concanamycin A	2 µM	V-Typ

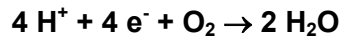
Ein Ansatz von 150 µl enthielt 100 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 15 µg Vesikelprotein und gegebenenfalls Inhibitoren, gestartet wurde die Reaktion mit 4 mM ATP. Nach entsprechenden Zeitabständen wurden Aliquots entnommen und schnell in kaltem vorgelegtem Wasser:DMSO 1:1 -Gemisch 1:65 verdünnt, gevortext und die Verdünnung ein zweites Mal wiederholt. Die ATP-Messung erfolgte in einem Biolumineszenzanalysator (Lumat LB 9507, EG&G Berthold, Wildbad, D). 50 mg Luciferin/ Luciferase - Lyophilisat (Buffered *Lantern Extract*, FLE-50, Sigma) wurden in 15ml Wasser gelöst und unlösliche Bestandteile abzentrifugiert. Für die Messung wurden jeweils 100 µl Probe vorgelegt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl des gelösten Luciferin/Luciferase-Lyophilisats gestartet. Die ATP-Konzentrationen der Proben wurde über extern gemessene Eichreihen im Bereich von 10 nM bis 1 µM bestimmt. Bei Ansätzen mit Inhibitoren wurden diese entsprechend der Eichreihe zugesetzt.

2.4.4 Atmungsaktivität (Darley-USmar, 1987)

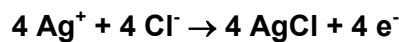
Zur unterstützenden Aussage über mitochondriale Kontaminationen wurde die Atmungsaktivität in der Präparation und im Lysat bestimmt.

Die Messungen erfolgten mit einer Typ „Clarke“-Sauerstoffelektrode. Eine silberbeschichtete Referenzanode umgibt ringförmig eine platinbeschichtete Kathode. Diese Elektroden waren in eine gesättigte KCl Lösung eingetaucht und durch eine Teflonmembran, die für Sauerstoff, nicht aber für Elektronen durchlässig war, von dem Reaktionsgefäß getrennt. Die Elektroden wurden bei einer Spannung von 0,6 V polarisiert.

An der Platinelektrode wurden Sauerstoffmoleküle zu Wasser reduziert:



Die Chloridanionen wanderten zur Anode und entliessen die Elektronen:



Der so entstandene Transfer von Elektronen von der Kathode zur Anode begründete einen Stromfluss zwischen den Elektroden, der in einem externem Kreislauf gemessen werden konnte. Dieser Strom war dem Sauerstoffpartialdruck in der Probe proportional. Daher wurde indirekt, über den Stromfluss, der Sauerstoffgehalt in der Probe gemessen. Der Strom in luftgesättigtem Wasser bei 20°C liegt bei wenigen Microampere. Mit 3 mM Succinat wurde die Atmungsreaktion gestartet.

2.4.5 Energetisierung vakuolärer Vesikel

Mit Hilfe von 9-Amino-6-Chloro-2-Methoxyacridin (9-ACMA) wurde getestet, ob die vakuolären Vesikel in der Lage waren, einen elektrochemischen Gradienten anzulegen. 9-ACMA ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich an die Membran anlagert, sobald diese polarisiert wird. Infolgedessen wird die Fluoreszenz unterdrückt (Fluoreszenz-Quenching). Diesem Vorgang liegt die Bildung von Komplexen aus 9-ACMA und geladenen Membrankomponenten zugrunde (Huang *et al.*, 1983). Der Vorgang des Quenchings konnte bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm photometrisch verfolgt werden.

Der spezifische Effekt wurde durch CCCP nachgewiesen, ein Protonophor, das den Protonengradienten zerstört. Nach Zugabe von CCCP wurde ein Wiederanstieg der Fluoreszenz erwartet.

Ein 2 ml Ansatz enthielt 50 mM MES-Tris pH 7,4, 5 mM MgSO₄, 2 µM ACMA und 50 µg Vesikelprotein. Die Küvette wurde auf 30°C erwärmt und der Ansatz ständig gerührt. Nach Erreichen einer Basislinie wurde die Energetisierung mit 1,5 mM ATP gestartet. Die Aufhebung des Membranpotentials erfolgte durch Zugabe von 4 µM CCCP.

2.4.6 Quantitative Bestimmung von Aminosäuren

Die Bestimmung von Aminosäuren, die trotz des hypoosmotischen Schocks in den Vesikeln verblieben waren, wurde mit HPLC durchgeführt. Die Trennung erfolgte auf einem HP 1090 M- (Hewlett Packard GmbH, Waldbronn, D) System mit einer Hypersil ODS 5 125 x 4,6 mm Trenn- und einer 40 x 4,6 mm Vorsäule (CS-Chromatographieservice, Langerwehe, D) bei 40°C. Die Detektion erfolgte durch ein Fluoreszenzdetektor HP 1046. Die Aminosäuren wurden durch automatische Präsäulenderivatisierung in fluoreszierende 2-Mercaptoethanol-substituierte Isoindole überführt (OPA-Reagenz: 0,08 % (w/v) OPA; 0,2 % (v/v) 2-Mercaptoethanol; 2,5 % Kaliumborat pH 10,4; 0,003 % (w/v) Brij®35). Die Trennung erfolgte durch ein Gradientenprogramm:

Tabelle 2.3 Gradientenprogramm für die Trennung von OPA-Mercaptoethanol-derivatisierten primären Aminosäuren (R. Hecker, Dissertation)

Zeit [min]	Laufmittel B	Flussrate	Anregungs-/ Detektionswellenlänge [nm]
0	25	0,5	230/450
7	30	0,5	230/450
20	50	0,5	230/450
25	65	0,5	230/450
35	Ende	0,5	-

(Laufmittel A: 0,1 M Natriumacetat pH 7,2; Laufmittel B: Methanol). Die quantitative Auswertung erfolgte durch externe Standardisierung.

2.4.7 Bestimmung von Transportaktivitäten

Zur Bestimmung der Substrataufnahme wurden ¹⁴C-markierte Substrate verwendet. Die Konzentration des Substrats wurde mit der unmarkierten Substanz eingestellt und die Radioaktivität so zugegeben, dass eine spezifische Radioaktivität von 0,03-0,05 Ci/mol vorlag. Die Vesikel (10-30 µg/Probe, maximale Konzentration im Ansatz 400µg/ml) wurden in Wasser und 10*Messpuffer (0,2 M MES-Tris pH 7,2, 0,2 M KCl, 0,04 M MgCl₂) aufgenommen und durch Zugabe von 1,5 mM ATP im Wasserbad unter Rühren energetisiert. Nach 30 bis 45 Sekunden wurde die Reaktion mit Substrat gestartet. In geeigneten Zeitintervallen wurden dem Ansatz Proben entnommen und über eine Vakuum- Filtrationsanlage schnell von dem umgebenden Medium mittels Filtration durch 0,1 M LiCl befeuchtete Glasfaserfilter (Typ F, Millipore, Eschborn) abgetrennt. Eine Probe wurde direkt, ohne Filtration gemessen. Die Filter wurden

zügig dreimal mit 2,5 ml 0,1 M LiCl nachgespült, nach Abschluss der Messreihe entnommen und mit 3 ml Szintillationscocktail (Canberra-Packard, Frankfurt) versetzt. Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach mindestens einstündiger Inkubation in einem Szintillationszähler (LS 6500, Beckmann Coulter, München). Über die Radioaktivität in der Gesamtprobe wurde die Menge des von den Vesikeln inkorporierten Substrats berechnet.

2.4.8 Bestimmung von Substratefflux

Effluxmessungen wurden der Literatur nach in der Vergangenheit maßgeblich an ganzen, permeabilisierten Zellen durchgeführt.

Für die Bestimmung von Substratefflux aus vakuolären Vesikeln wurden diese in einem Ansatzvolumen von 50 μ l (maximale Proteinkonzentration im Ansatz 400 μ g/ml) mit markiertem Substrat beladen. Nach Substrataufnahme, die durch zuvor gewonnene Aufnahmedaten bekannt war, wurde der Ansatz zügig in definiertem Volumen, 1:5 oder 1:20 mit 1*Meßpuffer, 1,5 mM ATP verdünnt und damit die Reaktion gestartet. Nach geeigneten Zeitintervallen wurden Proben aus dem Ansatz entnommen und, wie unter 2.4.7 beschrieben durch eine Vakuumfiltrationsanlage vom Medium abgetrennt. Durch die in den Vesikeln verbliebende Radioaktivität wurde die Veränderung der internen Substratkonzentration kalkuliert.

2.4.8.1 Abgrenzung des Effluxes von Counterflow

Der Substrataustausch vakuolärer Vesikel wurde in verschiedenen Ansätzen gemessen.

- Die separate Messung von Counterflow umfasste die Beladung von Vesikeln wie unter 2.4.8 beschrieben, mit unmarkiertem Substrat. Dem Verdünnungsvolumen wurde Radioaktivität zugesetzt, so dass in den filtrierten Vesikeln nur das Substrat zu detektieren war, dass durch Substrataustausch aufgenommen worden war.

Die Abgrenzung des Substrataustausches von Efflux oder Diffusion erfolgte durch Vergleich der Daten mit Effluxmessungen, die wie unter 2.4.8 beschrieben gewonnen worden waren.

- Eine gleichzeitige Abgrenzung des Substrataustausches von Diffusion oder Efflux wurde gegebenenfalls in weiteren Ansätzen vorgenommen. Die Beladung der Vesikel erfolgte mit ^3H -markiertem Substrat. Dem Verdünnungsvolumen wurde ^{14}C -Substrat zugesetzt. Über die Abnahme von ^3H wurde ab dem Verdünnungszeitpunkt der Nettoverlust an Substrat in den Vesikeln verfolgt. Über die Zunahme von ^{14}C ab dem Verdünnungszeitpunkt wurde die Substrataufnahme im Rahmen des Substratgentausches detektiert. Die eingesetzte

spezifische Radioaktivität von tritiiertem Substrat lag 8 fach über der von ^{14}C markiertem Substrat.

2.4.9 Berechnung interner Substratkonzentrationen

Vesikelinterne Substratkonzentrationen wurden anhand von Literaturdaten kalkuliert. Kakinuma *et al.*,(1981) zufolge haben vakuoläre Vesikel ein internes Volumen von 5,2 $\mu\text{l}/\text{mg}$ Protein.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.5.1.1 *Probenvorbereitung*

Zur Abreicherung von Lipid wurde eine Fällung in TCA/ Aceton durchgeführt. Zwischen 200 und 400 μg Vesikelprotein wurden aufgetaut und für 3 Stunden bei -20°C in 4-5 ml 11 % TCA in Aceton in einem Plastikgefäß gefällt. Die Suspension wurde 45' bei $15000 \times g$ zentrifugiert, das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen und jeweils 45' bei $15000 \times g$ zentrifugiert. Das Pellet wurde 15-20' an der Luft getrocknet und entweder sofort weiter verwendet oder über Nacht bei 4°C verwahrt.

Das Pellet wurde in 20 μl Lysispuffer aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. Nach zwei bis dreistündiger Inkubation bei maximal 30°C (um eine Carbamoylierung des Harnstoffs zu verhindern darf die Temperatur 30°C nicht übersteigen) und 800 rpm im Schüttelheizblock wurden weitere 10 μl Lysispuffer zugegeben und nochmals eine Stunde inkubiert. Die Proben wurden vor der Applikation auf Drystrips (18 cm, pH 4-7, Pharmacia) mit Rehydratisierungslösung auf ein Volumen von 350 μl aufgefüllt. Harnstoff bildet in konzentrierter Lösung komplexe Strukturen aus, die mit den sich anlagernden Sulfobetainen mit der Zeit ausfallen können. Die Proben wurden daher zwei bis dreimal 10 Minuten bei 13000 rpm zentrifugiert und der partikelfreie Überstand für die erste Dimension verwendet.

Alle Chemikalien wurden in Ultrapure Qualität verwendet. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden mit Handschuhen gesteckt und autoklaviert. Auch zum Ansetzen aller Lösungen, die im Rahmen der 2-D Elektrophorese verwendet wurden, sowie bei allen Arbeiten wurden Handschuhe getragen.

Lysispuffer:

5 M Harnstoff
2 M Thioharnstoff
0,5% Pharmalyte pH 3-10
75 mM DTT
0,5% SB 3-12

5 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff wurden als Stocklösung bei -80°C verwahrt. Vor Verwendung des Lysispuffers wurde 1 ml dieser Lösung auf 30°C , 800 rpm im Schüttelheizblock aufgetaut und nacheinander 5 μl Pharmalyte pH 3-10, 11,5 mg DTT und 5 mg SB 3-12 zugegeben, wobei wichtig war, dass die eine Substanz vor Zugabe der nächsten vollständig gelöst war. Die Temperatur der Lösung wurde konstant bei 30°C gehalten.

Rehydratisierungspuffer

Als Rehydratisierungslösung wurde der Überschuss an Lysispuffer verwendet. Die Probe wurde mit Rehydratisierungslösung auf 350 μl aufgefüllt.

2.5.1.2 1. Dimension

Für das Verfahren der In-Gel- Rehydratisierung wurden die Proben in Keramiksärge überführt, die Probenstreifen aufgelegt und während der 1. Dimension rehydratisiert.

Die Rehydratisierung erfolgte über 24 h und 72000 Vh (IPGphor, Pharmacia Biotech)

2.5.1.3 2. Dimension

Vor der 2. Dimension wurden die Probenstreifen in 1 % DTT in Equilibrierungspuffer 20 Minuten equilibriert. Um überschüssiges DTT zu entfernen und die reduzierten Cysteinreste durch Alkylierung zu stabilisieren wurden die Probenstreifen anschließend 20 Minuten in 4 % Iodacetamid in Equilibrierungspuffer geschüttelt. Die Streifen wurden kurz auf Filterpapier getrocknet und folgend auf die vorbereiteten Gele positioniert.

Die 2. Dimension lief 1 Stunde bei 20 mA , nach Entnahme der Probenstreifen und Verlegung des Pufferstreifens für weitere $2\frac{1}{2}$ Stunden bei 40 mA.

Equilibrierungslösung:

50 mM Tris Cl, pH 8,8
6 M Harnstoff
30% Glycerol
2% SDS

Um die Salzkonzentration so gering wie möglich zu halten, wurde kein Bromphenolblau zugesetzt. Zur Reduktion der Probenstreifen wurde in 20 ml Equilibrierlösung 1 % DTT frisch zugesetzt. Zur Alkylierung der Probenstreifen wurden in 20 ml Equilibrierlösung 4 % Iodacetamid frisch zugesetzt.

2.5.2 Färbung der Gele

Die Anfärbung der Spots erfolgte durch gereinigtes *Coomassie Brilliant Blue* (s. 2.5.1) für 45 Minuten. Die Gele wurden mit 8 % Methanol, 7 % Essigsäure entfärbt.

2.5.2.1 Reinigung von Coomassie nach Neuhoff et al., 1988

Für die Reinigung von Coomassie wurden 3-4 g Coomassie in 250 ml 7,5 % Essigsäure gelöst und auf 60-70°C erwärmt. Festes Ammoniumsulfat wurde bis zu einer Endkonzentration von 30 % eingerührt. Nach Abkühlen wurde der präzipitierte Farbstoff durch Filtrieren gewonnen. Der Farbstoff wurde in 100 ml warmen Methanol vollständig gelöst. Folgend wurden 200 ml Aceton zugegeben und die Lösung für mehrere Stunden bei 4°C stehen gelassen. Die Lösung wurde erneut filtriert und die organischen Lösungsmittel am Rotationsverdampfer zu Trockne eingengt. Die Färbelösung wurde in einer Konzentration von 0,2 % in 45 % Methanol, 10 % Essigsäure angesetzt.

2.5.3 In-Gel-Proteolyse

Die ausgeschnittenen Spots wurden einer In-Gel-Proteolyse unterzogen. Diese wurde in silikonbeschichteten Reaktionsgefäßen aus Polypropylen (SIGMA) angesetzt, um im Massenspektrum kein abgeriebenes Polymer zu detektieren. Die Lösungen wurden nach Möglichkeit sterilfiltriert, oder in höchstem Reinheitsgrad verwendet, um Staubfreiheit zu gewährleisten.

Die Proteinspots wurden zweimal fünf Minuten und anschließend 30 Minuten mit 50 mM Ammonium Hydrogencarbonat gewaschen, um die Gelstücke zu equilibrieren. Folgend wurde zweimal 30 Minuten mit 50 % Ammonium Bicarbonat, 50 % Acetonitril gewaschen, um die Gelstücke möglichst vollständig zu entfärben. Zugabe von 100 % Acetonitril für fünf Minuten ließ sie aufgrund der Wasserverdrängung schrumpfen und ausbleichen. In einer Speed Vac

wurden die Gelstücke vollständig getrocknet. Trypsin (10 µg/ml (Promega) in 25 mM Ammonium Hydrogencarbonat), wurde so lange zugegeben, bis die Gelstücke keine weitere Flüssigkeit mehr aufsogen.

Die Ansätze wurden mit 25 mM Ammonium Hydrogencarbonat überschichtet und über Nacht bei 30°C inkubiert. Zur Extraktion der Peptide wurde mindestens zwei Stunden vor einer Messung 10-20 µl Wasser zugegeben, sowie TFA zu einer Endkonzentration von 0,1 %. Vor der Auftragung auf das MALDI Target erfolgte eine Reinigung über C₁₈-Zip Tips (Millipore).

2.6 Analytik

2.6.1 Präparation des MALDI-Targets

Für die Messung der tryptisch verdauten Peptide wurde umkristallisierte α -Cyano-4-Hydroxymizsäure verwendet, da diese im bei der Wellenlänge der verwendeten Laserstrahlung Energie absorbiert und für die erwarteten Massen zwischen 1000 und 3000 Dalton geeignet ist. Die Matrix wurde 0,05% ig in ACN/ 0,1% TFA angesetzt.

Das Target wurde gründlich mit 1% TFA gereinigt und von Staub befreit.

Die Probe wurde mit 1 µl 50% ACN von der C₁₈-Zip Tip Säule auf das MALDI-Target eluiert. Die gleiche Säule wurde anschließend auf eine neue Position des Targets mit 1 µl 100% ACN eluiert. Auf jede Probe wurde 1 µl Matrixlösung gegeben. Die Kristallisation der Proben erfolgte bei Raumtemperatur.

2.6.2 Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation (MALDI) -MS

Die Messung der Proben erfolgte mit einem MALDI-Massenspektrometer Voyager-DETMST (BioSpectrometry Workstation) der Firma PerSpective Biosystems, Frankfurt am Main.

Beschleunigungsspannung:	20 kV
Extraction Modus:	delayed
Gridspannung:	66 %
Laser:	337 nm, die Laserleistung wurde individuell eingestellt
Low Mass Gate:	800 Da
Kalibrierung:	extern

Die Messung erfolgte im Reflektor-Modus. 3-4 Spektren mit je hundert Schüssen wurden zu einem Gesamtspektrum akkumuliert.

2.6.3 Datenbanksuche

Die Datenbanksuche mit den *fingerprints* wurde mit Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>) und Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) vorgenommen. Es wurden Restriktionen bezüglich des Organismus angegeben, N-terminale Acetylierung des Proteins und Oxidation von Methionin als mögliche, sowie Carbamidomethylierung als fixe Modifikation. 0,01 % Massentoleranz wurden zugelassen, sowie 1-2 Fehlschnitte des verdauenden Enzyms.

3. ERGEBNISSE

In dieser Arbeit wurden Fragestellungen des Stofftransportes über die vakuoläre Membran bearbeitet. Der bidirektionale Fluss von Metaboliten wurde anhand von *in vitro* Studien an vakuolären Vesikeln, präpariert nach normalen und nach limitierten Wachstumsbedingungen, untersucht. Ferner wurde die Adaption des Proteinmusters vakuolärer Membranen an limitierte Wachstumsbedingungen mit Hilfe der zweidimensionalen Gelelektrophorese beobachtet.

Grundlage dieser Projekte war eine Präparation hochgereinigter, transportkompetenter vakuolärer Vesikel.

3.1 Charakterisierung vakuolärer Vesikel aus *S. cerevisiae*

In der Literatur werden verschiedene Methoden für die Präparation intakter Vakuolen (Dürr *et al.*, 1975) und vakuolärer Vesikel (Oshumi & Anraku, 1981; Roberts *et al.*, 1991) beschrieben. In eigenen Vorarbeiten wurden mehrere dieser Präparationsmethoden durchgeführt und mit Leitenzymmessungen überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Qualität der Präparationen stellte sich für das Vorhaben dieses Projekts als unbefriedigend heraus, weil die Anreicherung vakuolärer Leitenzyme nicht ausreichend und der Anteil mitochondrialer Enzyme zu hoch war. Daher wurden in dieser Arbeit vakuoläre Membranen nach einer Methode von Roberts *et al.* 1991 verwendet, die, in modifizierter Form, eine hohe Anreicherung vakuolärer Leitenzyme bei sehr starker Abreicherung der Mitochondrien aufwies. Die Präparation konnte zügig in einem Zeitraum von 6 Stunden durchgeführt werden. Die Isolierung bestand im wesentlichen in der Protoplastierung der Zellen, gefolgt von einer hypotonen Lyse der Protoplasten und zwei sukzessiven Reinigungsschritten durch Flotierung auf diskontinuierlichen Ficoll 400-Gradienten. Die Präparation wurde nach Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff bei minus 80°C gelagert und war für mindestens zwei Monate stabil.

3.1.1 Güte der Präparation

Die modifizierte Methode nach Roberts *et al.*, (1991) ergab eine weiße Suspension vakuolärer Vesikel. Die Anreicherung vakuolärer Enzyme gab Aufschluss über die Qualität der Präparation. Da die Vesikel für Transportmessungen eingesetzt werden sollten, war es wichtig, insbesondere Kontaminationen von Mitochondrien, die ebenfalls Aminosäuren transportieren, abzuklären. In der folgenden Tabelle ist in Form eines Vergleiches der Leitenzymaktivitäten zwischen der Vesikelfraktion und dem Protoplastenlysat, die Güte der Präparation dargestellt.

Tabelle 3.1 Darstellung der An- und Abreicherung sowie der Ausbeute von Leitenzymen in der Vesikelpräparation

Enzym	+/-: An- bzw. Abreicherung der spezifischen Aktivität	Ausbeute in %
<u>vakuoläre Leitenzyme</u>		
V- ATPase	vollständige Hemmung durch Concanamycin A	nicht bestimmt
Dipeptidylaminopeptidase (DPAP) B	* 47	10
α - Mannosidase	* 45	10
<u>Leitenzyme kontaminierender Fraktionen</u>		
Dipeptidylaminopeptidase (DPAP) A (Golgi)	* 11	2,3
F ₀ F ₁ - ATPase (Mitochondrien)	keine Hemmung durch N ₃	nicht bestimmt
P-Typ ATPase (Plasmamembran)	keine Hemmung durch Na ₃ VO ₄	nicht bestimmt
Cytochrom-c- Oxidase (Mitochondrien)	* 3	0,7
Atmung (spez. Hemmung mit KCN) (Mitochondrien)	* 3	0,7
<u>+/- Faktor*: An - bzw. Abreicherung der spezifischen Aktivität in der Präparation im Vergleich der spezifischen Aktivität im Lysat</u>		

Die Aktivitäten der F₀F₁-, der V- und der plasmamembranständigen ATPase konnten durch den Zusatz spezifischer Inhibitoren voneinander unterschieden werden. In der vakuolären Präparation war die ATPase Aktivität vollständig mit dem spezifischen Inhibitor der V-ATPase, Concanamycin A, hemmbar. Die Präparation zeigte eine 47fache Anreicherung spezifischer Aktivitäten der vakuolären Leitenzyme Dipeptidylaminopeptidase B, die durch Inkubation bei 60°C von der thermostabilen Dipeptidylaminopeptidase A des Golgi-Apparates diskriminiert wurde, bzw. eine 45fache Anreicherung der α -Mannosidase. Die Ausbeute dieser Enzyme im Vergleich zum Zellhomogenat betrug 10 %. Eine Hemmung der Aktivität der mitochondrialen oder der plasmamembranständigen ATPase durch spezifische Inhibitoren (10 mM NaN₃, bzw. 0,1 mM Na₃VO₄) war nicht zu detektieren. Durch Messungen der Cytochrom-c-Oxidase und der Atmungsaktivität wurde eine mitochondriale Kontamination detektiert, die eine dreifache Anreicherung der spezifischen Leitenzymaktivität und eine Ausbeute von 0,7 % zeigte.

3.1.2 Energetisierung

Eine Voraussetzung für den Transport vieler Substrate in die Vakuole ist das Anliegen eines elektrochemischen Potentials über den Tonoplasten, das durch die V-ATPase generiert wird. Verschiedene Aminosäureaufnahme-systeme akkumulieren das Substrat im Antiport gegen ein Proton gegen das Konzentrationsgefälle in der Vakuole. Die Aktivität V-ATPase in den Vesikeln wurde bereits unter 3.1.1 gezeigt. Die Intaktheit der Vesikelmembran und deren Stabilität war eine Prämisse, um das aufgebaute elektrochemische Potential und in der Vakuole akkumulierte Substrate stabil halten zu können.

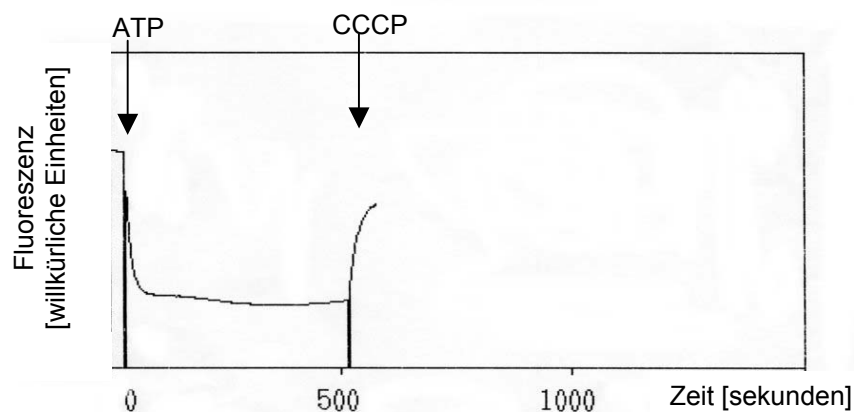


Abbildung 3.1 Membranpotentialmessung an vakuolären Vesikeln mit dem Fluoreszenzfarbstoff ACMA. Der Ansatz enthielt 50 μg Protein. Die Endkonzentration von 9-ACMA im Puffer lag bei 2 μM . Die Messung wurde bei einer Anregungswellenlänge von 410 nm und einer Emissionswellenlänge von 490 nm durchgeführt. Zu den markierten Zeitpunkten wurde 1,5 mM ATP zum Start der Energetisierung, bzw. 4 μM CCCP zur Aufhebung des Membranpotentials, zugegeben.

In dem Messansatz wurden Puffer, Protein und ACMA vorgelegt. Nach dem Erreichen einer Basislinie wurde die Reaktion mit ATP gestartet. Durch die Aktivität der V-ATPase wurde ein elektrochemisches Potential über der Membran angelegt. Infolgedessen lagerten sich die ACMA-Moleküle an der Membran an und die Fluoreszenz wurde unterdrückt (Fluoreszenz-*quenching*). Zum angegebenen Zeitpunkt wurde CCCP zugegeben, das als Protonophor wirkt und so das Protonenpotential entkoppelt. Da die ACMA-Moleküle wieder von der Membran wegdiffundierten, war photometrisch ein Wiederanstieg der Fluoreszenz zu beobachten. Die Vesikel hielten das Membranpotential mindestens über zehn Minuten aufrecht. Die Zeitspanne sowohl für Aufnahme-, als auch für Effluxmessungen lag innerhalb dieses Zeitfensters, so dass alle Voraussetzungen für Transportstudien mit diesen Vesikeln gegeben waren.

3.1.3 Quantifizierung von Aminosäuren

Für die Berechnung interner Substratkonzentrationen nach Aufnahme- und Effluxmessungen musste berücksichtigt werden, ob gegebenenfalls ursprünglich von der Zelle in der Vakuole gespeicherte Substrate in den präparierten Vesikeln verblieben waren. Quantitative Aminosäuremessungen mittels HPLC zeigten, dass nur ein vernachlässigbarer Anteil an Aminosäuren in der Präparation vorlag.

3.1.4 Transportkompetenz

Daten über die Aufnahme verschiedener Aminosäuren wurden bereits in der Literatur beschrieben (Sato *et al.*, 1984). Um die Transportkompetenz der Vesikel zu prüfen wurde die Aufnahme verschiedener, von der Vakuole gespeicherter Aminosäuren gemessen.

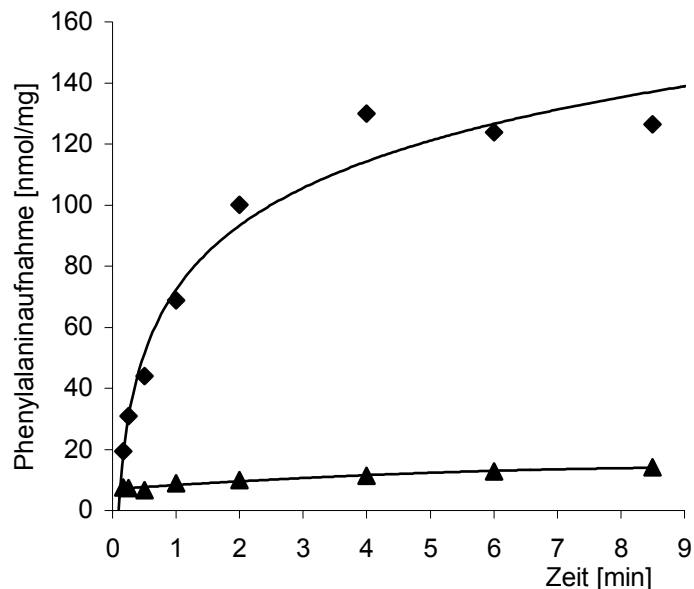


Abbildung 3.2 Phenylalaninaufnahme bei 4 mM Substrat (♦). Die Negativkontrolle erfolgte unter Zugabe von 1,5 mM ADP (▲) statt ATP.

Die in Abb. 3.2 dargestellte Aufnahme von Phenylalanin belegt die Transportkompetenz der Vesikel. Für die Phenylalaninaufnahme ist ein K_t Wert von 1 mM und eine spezifische Aktivität von $83 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in der Literatur beschrieben (Sato *et al.*, 1984). Die hier durchgeführte Aufnahme bei 4 mM erfolgte mit einer spezifischen Aktivität von $80 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$. Die interne Konzentration wurde über mindestens 9 Minuten gehalten. Diese Information war eine wichtige Grundlage für spätere Effluxexperimente, bei denen vor der Datenaufnahme eine Vorbeladung der Vesikel durchgeführt werden musste (s. 3.4). Die Aufnahme von Aminosäuren in vakuoläre Vesikel erfolgt für viele Aminosäuren als sekundärer Transport (Sato *et al.*, 1984). Typische

Eigenschaften carriervermittelten Transports, wie Substrat- und Proteinabhängigkeit wurden überprüft. Diese Versuche wurden mit Phenylalanin durchgeführt.

3.1.4.1 Substratabhängigkeit

Die erwartete Abhängigkeit der Substrataufnahme von der Substratkonzentration wird in Abbildung 3.3 gezeigt.

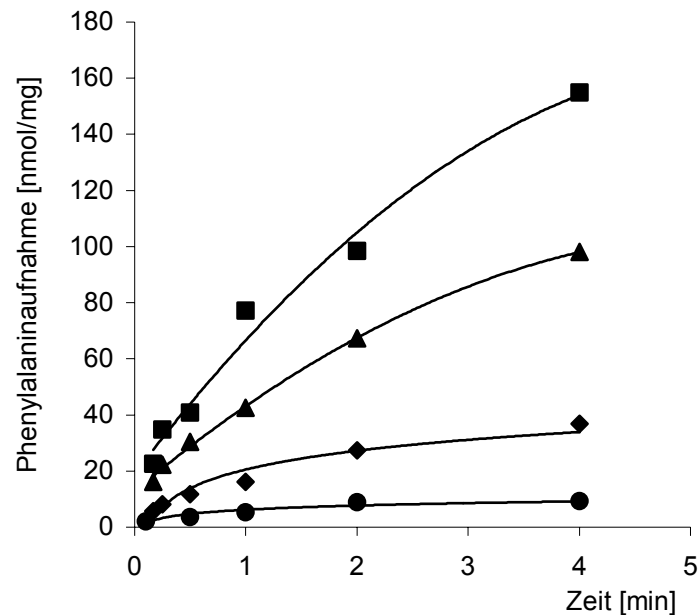


Abbildung 3.3 Substratabhängigkeit der Phenylalaninaufnahme in vakuoläre Vesikel. 0,1 mM (●), 0,5 mM (◆), 2 mM (▲), 4 mM (■).

In Abhängigkeit der Konzentration akkumulierten die Vesikel das angebotene Substrat. Die höchste Anreicherung wurde bei niedrigen externen Konzentrationen gemessen. Die Akkumulation des Substrats folgte dem Verlauf einer Sättigungskurve.

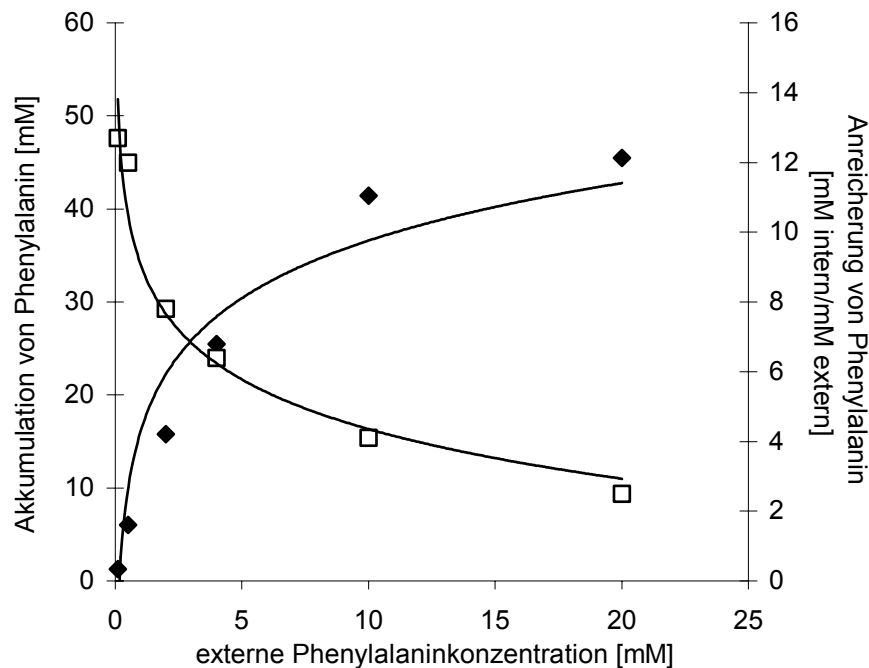


Abbildung 3.4 Akkumulation (◆) [mM intern] und Anreicherung (□) [mM intern/mM extern] von Phenylalanin in vakuoläre Vesikel.

Die Akkumulation des Substrats stieg mit zunehmendem Substratangebot so lange an, bis die externe Konzentration 10 mM und die interne 42 mM betrug. Ab dieser äußeren Konzentration stagnierte die interne Konzentration nahezu bei ca. 44 mM. Die Anreicherung von Phenylalanin war bei 0,1 mM bis 0,5 mM externem Substratangebot 12fach, bei höheren Konzentrationen nahm sie rapide ab.

3.1.4.2 Proteinabhängigkeit

Als weiterer Parameter carriervermittelten Transports wurde die Proteinabhängigkeit der Phenylalaninaufnahme gemessen. Es bestand eine klare Abhängigkeit des aufgenommenen Substrats von der eingesetzten Proteinmenge: mit zunehmender Proteinmenge je Probe wurde entsprechend mehr Substrat aufgenommen. Oberhalb einer Proteinkonzentration von 450 µg/ml wurde das Substrat intern nicht mehr über die gleiche Zeitspanne konstant gehalten, wie bei niedrigeren Konzentrationen. Dies wird in der folgenden Grafik, in der die Daten in nmol/mg Protein dargestellt sind (s. Abb. 3.5), deutlich. Die Initialaktivität war bei den verschiedenen Ansätzen wie erwartet identisch. Bis zu einer Proteinkonzentrationen von 450 µg/ml zeigten die Vesikel ein Sättigungsverhalten in der Substrataufnahme, wobei die interne Substratkonzentration über mindestens 6 Minuten stabil blieb. Bei höherer Proteinkonzentration

(s. Abb. 3.5: 1,1 mg/ml) war ein Substratverlust zu detektieren. Dieser Effekt war bei weiter zunehmender Proteinkonzentration verstärkt ausgeprägt (s. Abb. 3.5: 2 mg/ml).

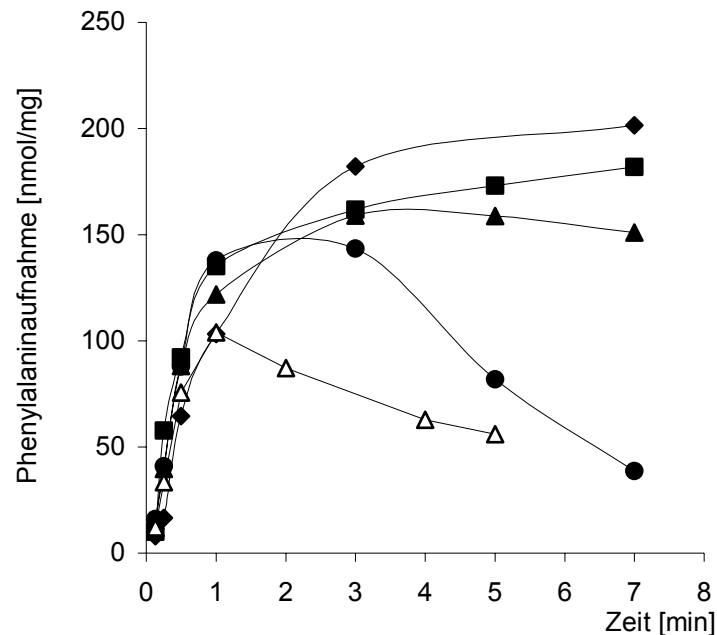


Abbildung 3.5 Proteinabhängigkeit der Phenylalaninaufnahme (nmol/mg Protein) in vakuoläre Vesikel. 2 mg/ml (Δ), 1,1 mg/ml (●), 450 µg/ml (▲), 180 µg/ml (■), 90 µg/ml (◆).

Bei den Aufnahmemessungen musste folglich beachtet werden, dass eine Proteinkonzentration von 450 µg/ml nicht überschritten wurde. Diese Information war insbesondere bei der Messung solcher Substrate wichtig, die nur in geringer Menge aufgenommen werden, sowie für die Effluxexperimente, bei denen die Beladung der Vesikel in einem volumenreduziertem Ansatz (s. Abschnitt 3.4) erfolgen musste.

3.2 Zusammenfassung der Substrataufnahmedaten

Vakuoläre Vesikel, präpariert nach Wachstum auf YPD-Medium, zeigten bei der Phenylalaninaufnahme eine höhere spezifische Aktivität, als Vesikel die aus Zellen nach Wachstum auf CBS-Medium isoliert worden waren. Der K_t -Wert wurde nach Wachstum auf YPD bestimmt. Für den Vergleich von Daten wurden immer Vesikel verwendet, die unter analogen Bedingungen auf CBS-Medium angezogen worden waren. In der folgenden Tabelle sind die gemessenen kinetischen Aufnahmedaten vakuolärer Vesikel zusammengefasst.

Tabelle 3.2 Zusammenfassung kinetischer Daten der Substrataufnahme in vakuoläre Vesikel aus Wildtypzellen, die unter Normalbedingungen angezogen wurden.

Stamm	Substrat	Spezifische Aktivität [$\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$]	K_t [mM]
wt	Arginin	80	1,3
	Lysin	35	0,2
	Phenylalanin	83 (YPD)	0,93
		45 (CBS)	
	Threonin	30	-
	Glutamat	-	-
	Ornithin	26	-
	Spermin	6	-
	Putrescin	2,3	-

Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Daten (Sato *et al.*, 1984) konnte eine ATP-abhängige Aufnahme von Threonin beobachtet werden.

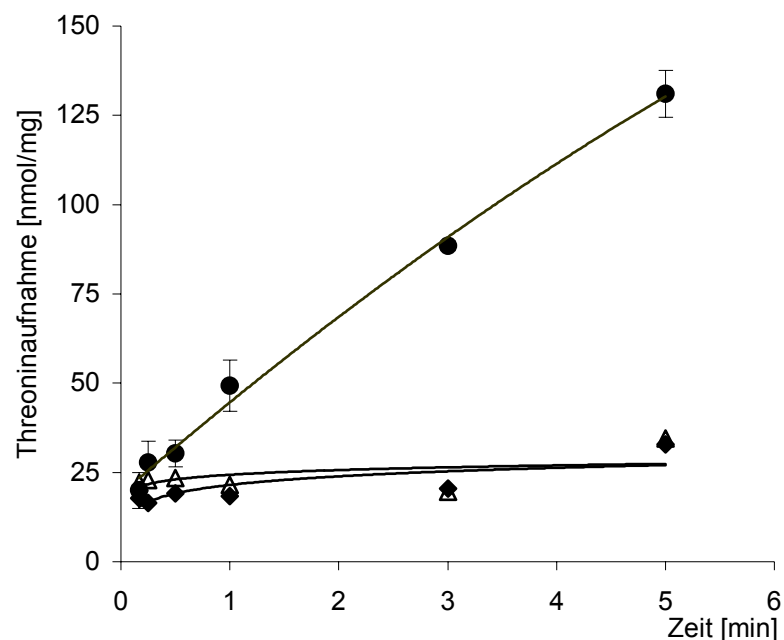


Abbildung 3.6 Aufnahme von Threonin in vakuoläre Vesikel. +ATP (●); +ATP+CCCP (◆); +ADP (Δ).

Bei 4 mM externer Threoninkonzentration wurde das Substrat mit einer spezifischen Aktivität von $30 \text{ nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ in die Vesikel transportiert. Nach Zugabe von ADP statt ATP konnte keine Aufnahme detektiert werden. Auch die Zugabe von CCCP, einem Entkoppler des pH-Gradienten, zum Startzeitpunkt der Reaktion führte dazu, dass kein Threonin in die Vesikel aufgenommen wurde. Diese Negativkontrollen belegten die energieabhängige Aufnahme von Threonin in vakuoläre Vesikel.

3.3 Untersuchung putativer vakuolärer Polyamincarrier

Die Vakuole dient in der Zelle als Speicherorganell für Polyamine. Diese haben einen Einfluss auf die Biosynthese von RNA, DNA und Proteinen. Anhand des Gens eines *multidrug transporters* in *Bacillus subtilis*, der die Exkretion von Polyaminen katalysiert (Woolridge *et al.*, 1997), wurden durch sequenzvergleichende Studien mit dem Genom der Hefe vier mögliche Polyamincarrier detektiert (Igarashi *et al.*, 1999). Zwei der entsprechenden Gene, *YCR023c* und *YLL028w*, wurden im Rahmen dieser Arbeit näher untersucht.

3.3.1 Der putative Polyamintransporter Ycr023cp

Die vermutete Beteiligung des *YCR023c* Genprodukts an dem vakuolären Import von Polyaminen, vorzugsweise Spermin, sollte überprüft werden. Nach Konstruktion einer Deletionsmutante *ycr023c::lacZ* (M. Albertsen) wurden aus diesem Stamm vakuoläre Vesikel isoliert und auf ihre Transportkompetenz bezüglich Spermin im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Um die Expression der Polyamintransporter zu induzieren, wurden die Zellen unter Zugabe von 10 mM Putrescin, 1 mM Spermin und 1 mM Spermidin angezogen.

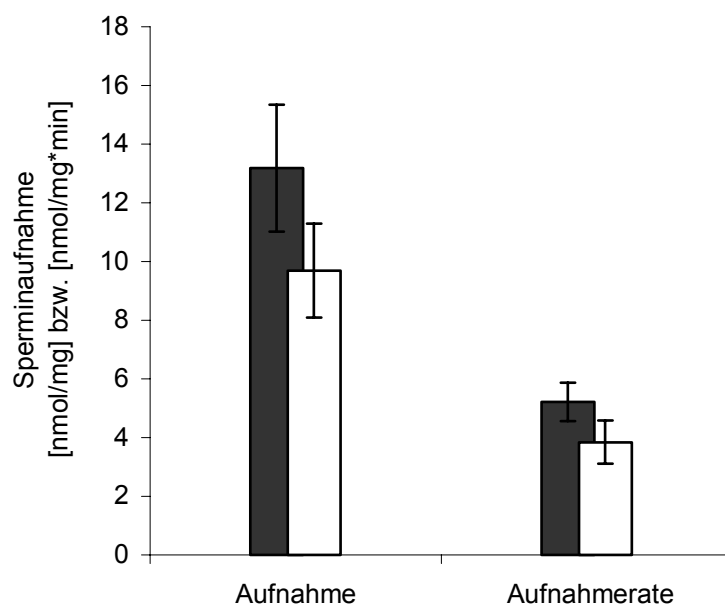


Abbildung 3.7 Sperminaufnahme in vakuoläre Vesikel des Wildtyps (■) und der Deletionsmutante *ycr023c::lacZ* (□). Angegeben sind die Gesamtaufnahme [nmol/mg] und die spezifische Aufnahmerate [nmol·mg⁻¹·min⁻¹].

Sowohl die Gesamt- als auch die spezifische Aktivität der Sperminaufnahme waren im Vergleich zum Wildtyp geringfügig vermindert. Um die Daten zu gegeneinander abzuwägen,

wurde als Referenz in beiden Stämmen die Aufnahme von Phenylalanin gemessen, die durch die Deletion nicht beeinflusst war. In der folgenden Grafik werden die spezifische und die Gesamtaktivität, mit Phenylalanin als Referenz, in der Form (Spermin/Phenylalanin) dargestellt.

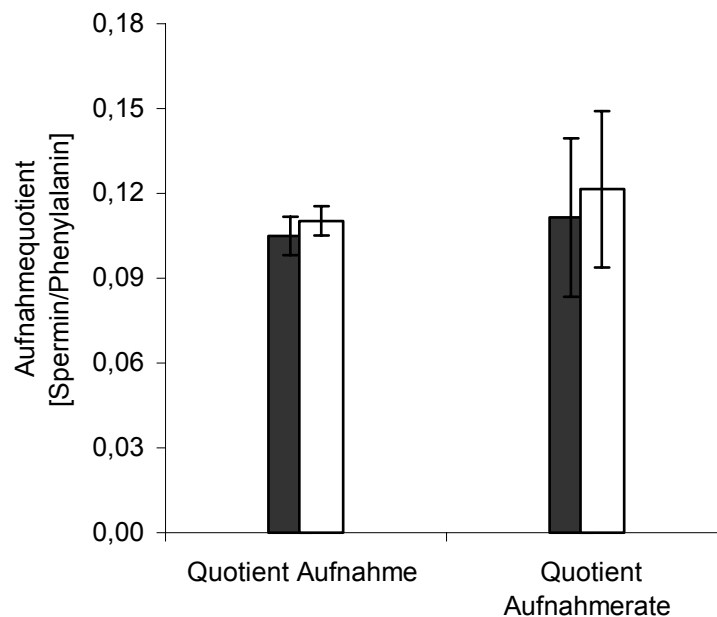


Abbildung 3.8 Sperminaufnahme bezogen auf Phenylalaninaufnahme. Verglichen wurden der Wildtyp (■) und die Deletionsmutante *ycr023c::lacZ* (□). Die Sperminaufnahmemessung erfolgte bei 0,5 mM, die Phenylalaninaufnahme bei 4 mM. Angegeben sind die Aufnahme [nmol/mg] und die Aufnahmerate [nmol·mg⁻¹·min⁻¹].

Es bestand weder in der spezifischen, noch in der Gesamtaktivität ein signifikanter Unterschied der Sperminaufnahme zwischen den beiden Stämmen.

3.3.2 Der putative Polyamintransporter Yll028wp

Das von dem ORF *YLL028w* codierte Protein Tpo1p (*t*ransporter for *p*olyamine) wurde als erstes von vier vakuolären Polyamintransportern identifiziert (Igarashi *et al.*, 1999). Das Genprodukt von *TPO1* wird in der Literatur als putativer Aufnahmecarrier der Vakuole für Polyamine, vorzugsweise Spermin, beschrieben (Tomitori *et al.*, 2001). Lokalisationsstudien mit Hilfe von kontinuierlichen Saccharosegradienten und Antikörpern gegen das HA-gekoppelte Genprodukt des ORF *YLL028w* zeigten aber eine Lokalisation des Proteins in der Plasmamembran (M. Albertsen).

Weitere Experimente, in denen in der Deletionsmutante *tpo1::lacZ* der Polyaminexport aus ganzen Zellen untersucht wurde, zeigten, dass die Ausscheidung von Putrescin deutlich reduziert war (M. Abertsen, unveröffentlichte Daten). Diese Ergebnisse legten nahe, dass es

sich bei dem Genprodukt nicht um ein Sperminaufnahmecarrier der Vakuole, sondern um einen Exportcarrier für Putrescin in der Plasmamembran handelte. In weiterführenden Experimenten sollten Aufnahmedaten von Polyaminen in vakuoläre Vesikel der Deletionsmutante *tpo1::lacZ* gewonnen und mit dem Wildtyp verglichen werden. Nach den veröffentlichten Daten, die einen Aufnahmecarrier in der vakuolären Membran postulieren, wäre eine erniedrigte Aufnahme in die Vesikel zu erwarten gewesen. Wie bereits unter 3.3.1 beschrieben, wurden die Zellen unter Zugabe von 10 mM Putrescin, 1 mM Spermin und 1 mM Spermidin angezogen, um die Expression der Polyamintransporter zu induzieren. Parallel wurde wiederum die Aufnahme von Phenylalanin in die Vesikel des Wildtyps und des *tpo1::lacZ* Stammes gemessen und als Referenz in die Darstellung einbezogen.

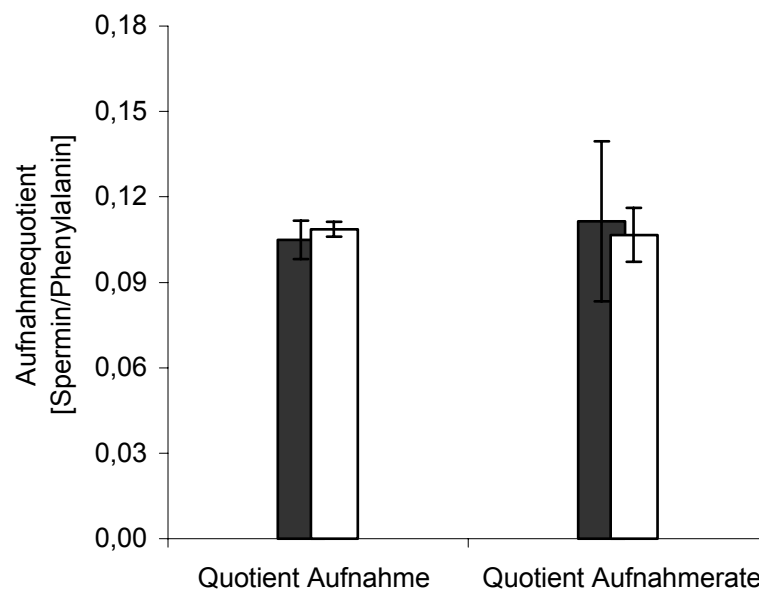


Abbildung 3.9 Sperminaufnahme bezogen auf Phenylalaninaufnahme. Verglichen wurden der Wildtyp (■) und die Deletionsmutante *tpo1::lacZ* (□). Die Sperminaufnahmemessung erfolgte bei 0,5 mM, die Phenylalaninaufnahme bei 4 mM. Angegeben sind die Aufnahme [nmol/mg] und die Aufnahme rate [nmol·mg⁻¹·min⁻¹].

Die Messungen zeigten, dass die Deletion des ORF *YLL028w* keinen Unterschied der Sperminaufnahme in vakuoläre Vesikel im Vergleich zum Wildtyp verursachte. Ferner wurde die Aufnahme von Putrescin gemessen.

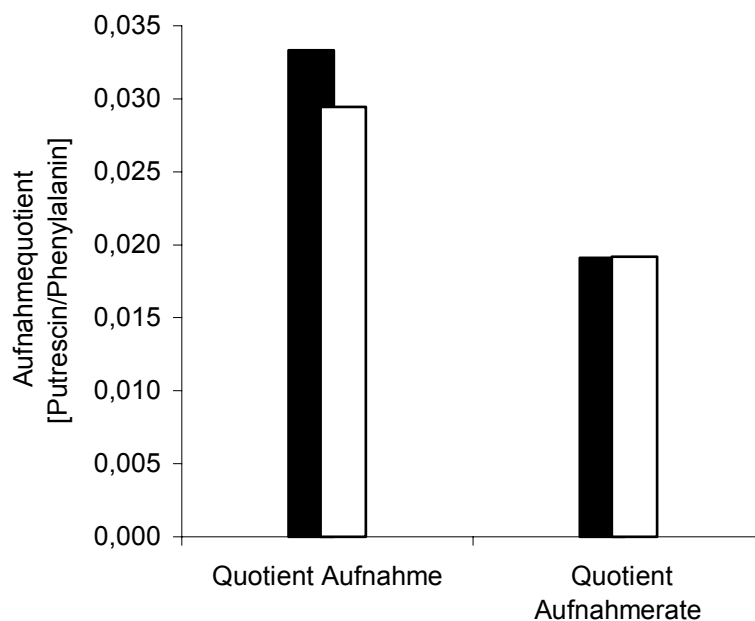


Abbildung 3.10: Putrescinaufnahme bezogen auf Phenylalaninaufnahme. Verglichen wurden der Wildtyp (■) und die Deletionsmutante *tpo1::lacZ* (□). Die Putrescinaufnahmemessung erfolgte bei 1 mM Substrat, die Phenylalaninaufnahme bei mM. Angegeben sind die Aufnahme [nmol/mg] und die Aufnahme rate [nmol·mg⁻¹·min⁻¹].

Auch in der Aufnahme von Putrescin bestand kein Unterschied zwischen dem Wildtyp und dem *tpo1::lacZ*-Stamm.

3.4 Substratefflux aus vakuolären Vesikeln

Die Funktion der Vakuole als Speicherorganell verschiedener Aminosäuren und die Mobilisierung von Arginin unter Stickstofflimitation (Messenguy *et al.*, 2000) bedingt die Notwendigkeit eines effektiven bidirektionalen Metabolitenaustausches zwischen der Vakuole und dem Cytoplasma. Während verschiedene Aufnahmesysteme in der vakuolären Membran bereits biochemisch (Sato *et al.*, 1984 a/b) und zum Teil molekularbiologisch (Rusznak *et al.*, 2001) charakterisiert wurden, ist über den Export von Substraten nur wenig bekannt. Neueren Daten zufolge wird der Modus eines H⁺/Aminosäure Symports für den Fluss von Metaboliten aus der Vakuole in das Cytoplasma diskutiert (Sagne *et al.*, 2001; Rusznak *et al.*, 2001). Ferner gibt es Hinweise in *P.cyclopium*, dass die aktuelle Substratkonzentration in der Vakuole von einer aktiven energieabhängigen Aufnahme und einem energieunabhängigen Efflux reguliert werden, die von verschiedenen Faktoren abhängig sein können (Roos *et al.*, 1997). Untersuchungen zum Substratefflux aus vakuolären Vesikeln sollten weiterführende Daten der Regulation des Substrataustausches über die vakuoläre Membran liefern.

Effluxmessungen umfassen prinzipiell folgende Schritte: die Vesikel werden mit Substrat beladen und anschließend vollständig von dem umgebenden Medium getrennt. Das Resuspendieren des Materials in definiertem Medium stellt gleichzeitig den Start der Effluxreaktion dar. Zur Trennung der Vesikel von dem Aufnahmemedium wurden verschiedene Möglichkeiten getestet: Zentrifugation, sowie Filtration über Glasfaser- und Nitrocellulosefilter. Die Methoden erwiesen sich als ungeeignet. Die Vesikel ließen sich aufgrund ihres hohen Lipidanteils nicht quantitativ pelletieren und die Resuspendierung der Vesikel von Glasfaser- und Nitrocellulosefiltermembranen konnte aufgrund deren Adsorption an die Membranen nicht quantitativ reproduzierbar durchgeführt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde der Efflux gestartet, indem die Beladung der Vesikel in einem stark volumenreduzierten Ansatz durchgeführt und dieser nachfolgend verdünnt wurde. Wie unter 2.4.8 beschrieben wurden die Vesikel in einem möglichst geringem Volumen (50 µl) und einer maximalen Proteinkonzentration von 450 µg/ml (s. 3.1.4.2) beladen. Nach dem Erreichen der gewünschten internen Konzentration wurde der Ansatz mit Messpuffer, 1,5 mM ATP und variablem Volumen Wasser verdünnt.

- 1) um Efflux zu messen, wurden die Vesikel mit markiertem Substrat beladen und dem Verdünnungsvolumen kein weiteres Substrat zugesetzt.
- 2) zur Messung von Substratgentausch wurden die Vesikel mit nicht markiertem Substrat beladen und unter Zusatz von markiertem Substrat verdünnt. Der Schritt der Verdünnung wurde hier beibehalten, um den gleichen experimentellen Ablauf wie unter 1) zu gewährleisten.

Die Substrataufnahme der Vesikel in einem für die Effluxexperimente ausgehenden deutlich reduziertem Ansatzvolumen wurde vorausgehend, geprüft indem direkt aus diesem die Substrataufnahme gemessen wurde.

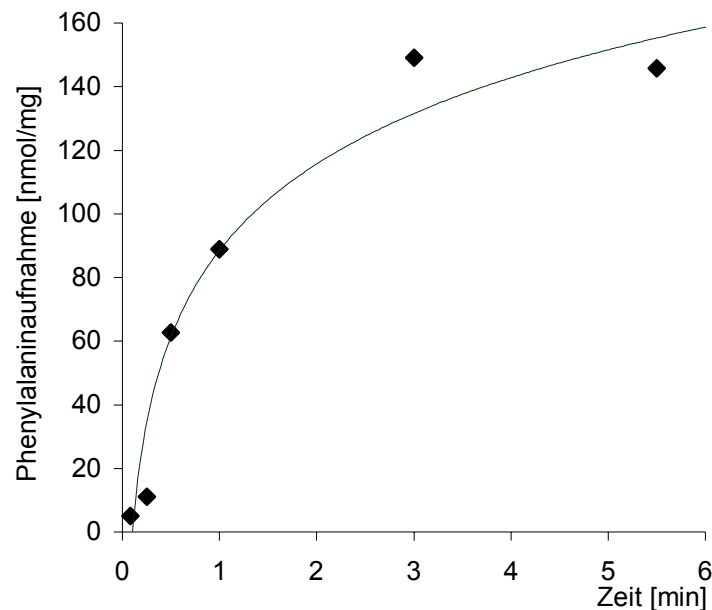


Abbildung 3.11 Phenylalaninaufnahme in einem 50 μ l Ansatz, mit einer Proteinkonzentration von 200 μ g/ml und einer Proteimenge von 1,1 μ g/Probe.

Die Substrataufnahme in einem stark volumenreduzierten Ansatz erfolgte mit gleicher Aktivität und war gleich gut detektierbar wie die der üblichen Aufnahmemessungen (s. 3.1.4). Entsprechend musste eine Wiederfindung von 140 nmol Phenylalanin/mg Protein nach Start des Effluxes vorliegen. Die Vesikel wurden bis zu dieser Konzentration mit Substrat beladen und der Efflux durch Verdünnung mit Puffer und ATP gestartet. Die spezifische Radioaktivität wurde nicht verändert. Die Messung von Phenylalanin unter den oben beschriebenen Bedingungen zeigte einen Nettoverlust an Substrat (s. Abb. 3.12).

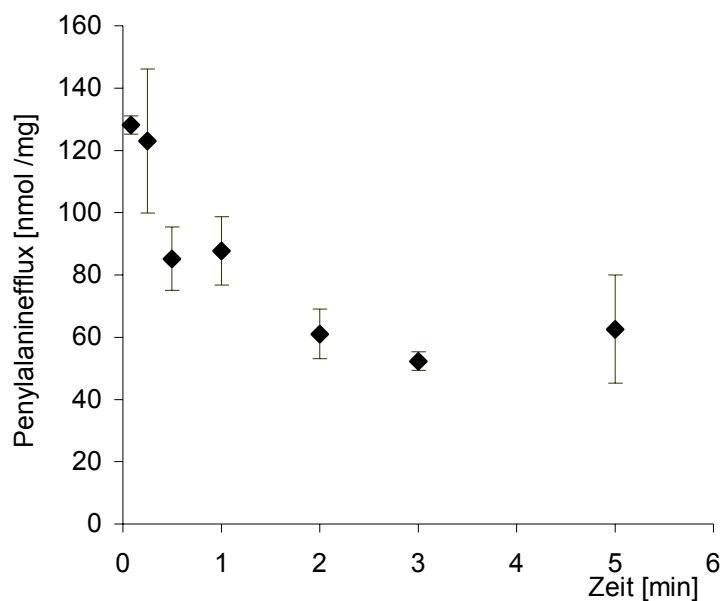


Abbildung 3.12 Phenylalaninefflux: Die Beladung der Vesikel erfolgte mit markiertem Substrat. Nach maximaler Beladung wurde 20fach verdünnt. Die detektierbare Substratabnahme entsprach einem Nettoverlust von Substrat nach Start durch die Verdünnung.

3.4.1 Lysinefflux

Im folgenden wurde der Einfluss von CCCP auf den Efflux von Lysin untersucht, sowie der Zusatz von Substrat in das Verdünnungsvolumen. CCCP ist ein Protonophor, das den zur Substrataufnahme essentiellen elektrochemischen Gradienten zerstört. Nach separaten Aufnahmedaten wurde nach maximaler Beladung eine interne Konzentration von 65 nmol/mg Protein erwartet. Diese lag bei Start des Effluxes vor. Eine 1:5 Verdünnung führte zu einem Nettoverlust an Substrat. Wie in Abbildung 3.13 zu erkennen ist, verursachte die Aufhebung des elektrochemischen Potentials durch CCCP eine deutlich beschleunigte Abnahme des internen Substrats gegenüber dem Efflux ohne das Protonophor.

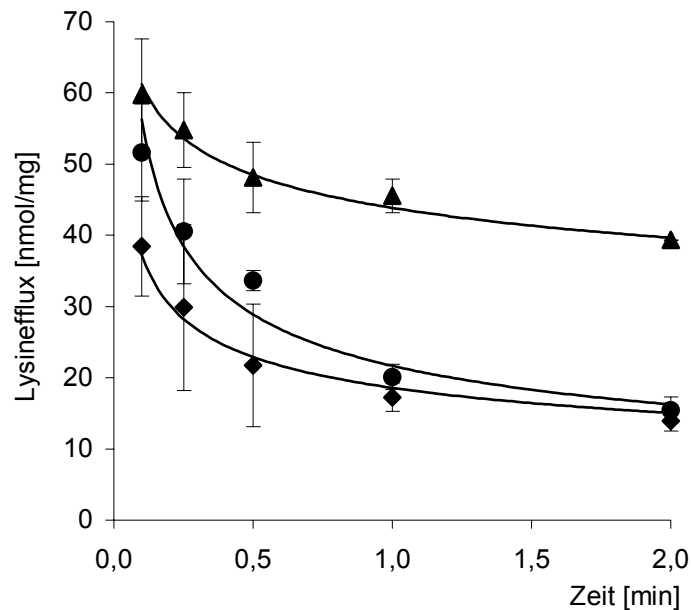


Abbildung 3.13 Lysinefflux nach maximaler Beladung mit markiertem Substrat. Es wurde nur mit Puffer und ATP, unter Zusatz von CCCP, oder unter Zusatz von Substrat verdünnt. 1:5 (▲), 1:5 +CCCP (●), 1:5 +Lysin (◆).

Die Zugabe von Substrat in das Verdünnungsvolumen führte ebenfalls zu einer verstärkten Abnahme detektierbarer Radioaktivität in den Vesikeln (s. Abb. 3.13). Letzterem lag Gegentausch des Substrats zugrunde: die spezifische Radioaktivität wurde durch den Zusatz von Lysin in das Verdünnungsvolumen erniedrigt, so dass die Vesikel im Modus des Substratgentausches nach der Verdünnung relativ weniger Radioaktivität aufnahmen als während der Beladung. Eine Aussage darüber, ob hier zusätzlich ein Nettoverlust stattfand, ist anhand dieser Daten nicht zu treffen.

Eine unterschiedlich starke Verdünnung der beladenen Vesikel hatte ebenfalls einen Effekt auf den Substratverlust (s. Abb. 3.14): nach einer 20fachen Verdünnung erfolgte der Substratverlust mit höherer Geschwindigkeit im Vergleich zu dem nach einer 5fachen Verdünnung. Zwischen diesen Experimenten lagen zum Start des Effluxes durch die unterschiedliche Verdünnung jeweils eine veränderte Proteinkonzentration und eine veränderte externe Substratkonzentration vor.

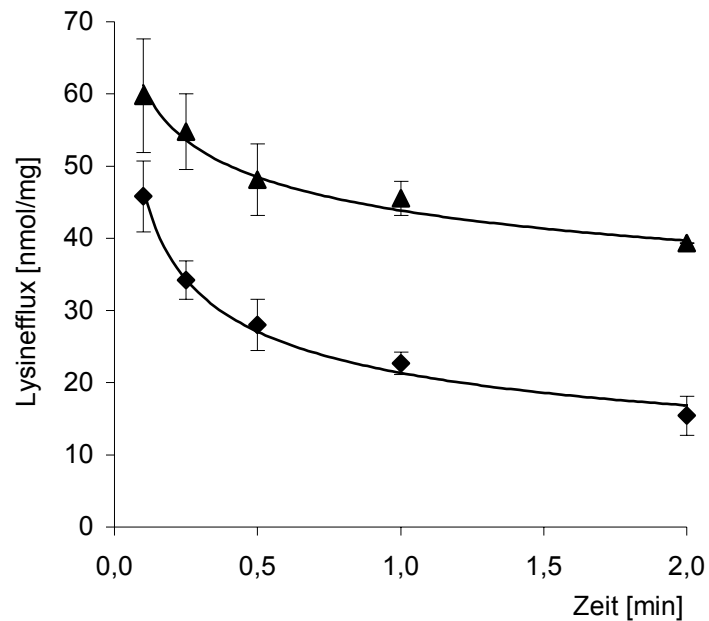


Abbildung 3.14 Lysinefflux nach maximaler Beladung mit markiertem Substrat. Die Verdünnung erfolgte 1:5 (▲) und 1:20 (◆).

Um ausschließlich den Einfluss des Substratgradienten über die Membran zu untersuchen, wurde im folgenden nicht nach maximaler Beladung, sondern nach 1, 2, 3 und 4 Minuten der Efflux durch Verdünnung eingeleitet. Aufnahmemessungen war zu entnehmen, dass die Vesikel nach 5-6 Minuten das Substrat maximal akkumuliert hatten. Demzufolge lagen nach oben genannten Zeitpunkten unterschiedliche interne Substratkonzentrationen vor und, nach jeweils gleicher Verdünnung, die gleiche externe Substratkonzentration mit entsprechend unterschiedlichen Substratgradienten über der Membran. Folglich unterschieden sich die Ansätze ausschließlich in dem Substratgradienten über der Membran infolge verschiedener interner Substratkonzentrationen zum Startzeitpunkt des Effluxes. Die Geschwindigkeit des Effluxes nahm mit zunehmender interner Substratkonzentration zu und stagnierte bei einem Wert von 35 nmol/mg Protein (s. Abb. 3.15).

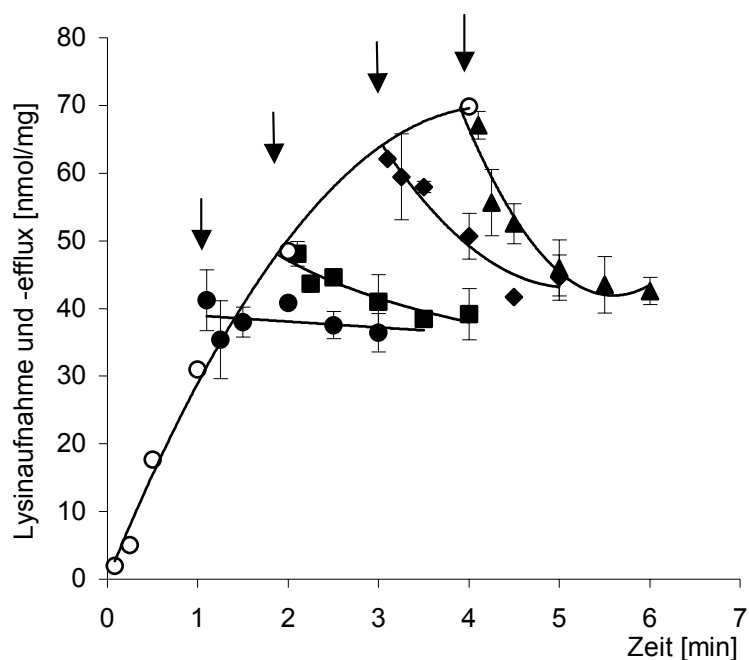


Abbildung 3.15 Lysinefflux: Die Beladung der Vesikel erfolgte bei 0,4 mM. Zur Verdeutlichung der erwarteten internen Konzentration zum Startzeitpunkt des Effluxes ist eine Aufnahmemessung mit dargestellt (○). Zu den markierten Zeitpunkten, nach 1 (●), 2 (■), 3 (◆) und 4 Minuten (▲) wurde der Efflux durch 5fache Verdünnung gestartet.

Die detektierten Geschwindigkeiten des Effluxes von Lysin wurden in Tabelle 3.3 zusammengefasst.

Tabelle 3.3 Lysinefflux bei unterschiedlichen internen Konzentrationen und nach 5facher Verdünnung

Aufnahme [min]	Lys intern [nmol/mg]	Lys extern [mM]	v [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]
1	36	0,08	0,5
2	48	0,08	8
3	62	0,08	17
4	69	0,08	36,5

Die nach der Verdünnung extern vorliegende Substratkonzentration lag bei 0,08 mM. Bei dieser Konzentration wurde eine Aufnahmemessung durchgeführt und das Ergebnis in die Darstellung des oben gezeigten Lysineffluxes integriert (s. Abb. 3.16). Die maximale Akkumulation bei einer externen Konzentration von 0,08 mM lag bei ca. 35 nmol/mg Protein. Diese interne Konzentration entsprach der, die nach Substratefflux erreicht und nicht weiter unterschritten wurde (s. Abb. 3.16).

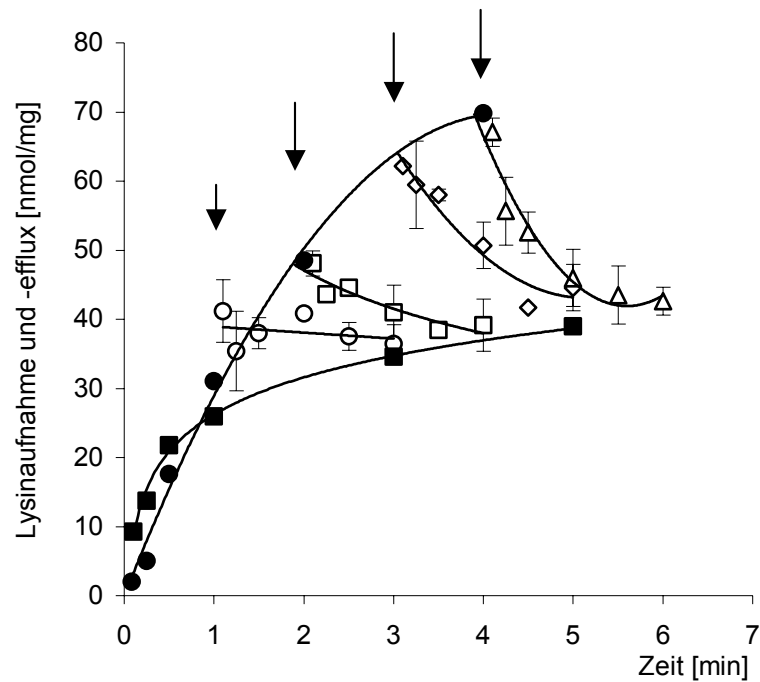


Abbildung 3.16 Lysinefflux: Beladung der Vesikel bei 0,4 mM (●). Nach 1 (○), 2 (□), 3 (◇) und 4 Minuten (Δ) wurde Efflux durch 5fache Verdünnung gestartet. Zusätzlich wurde die Aufnahme von Lysin bei 0,08 mM Substrat dargestellt (■).

Die in der folgenden Abbildung aufgetragene Akkumulation von Lysin in vakuoläre Vesikel in Abhängigkeit von der externen Substratkonzentration verdeutlicht die oben beschriebenen Ergebnisse:

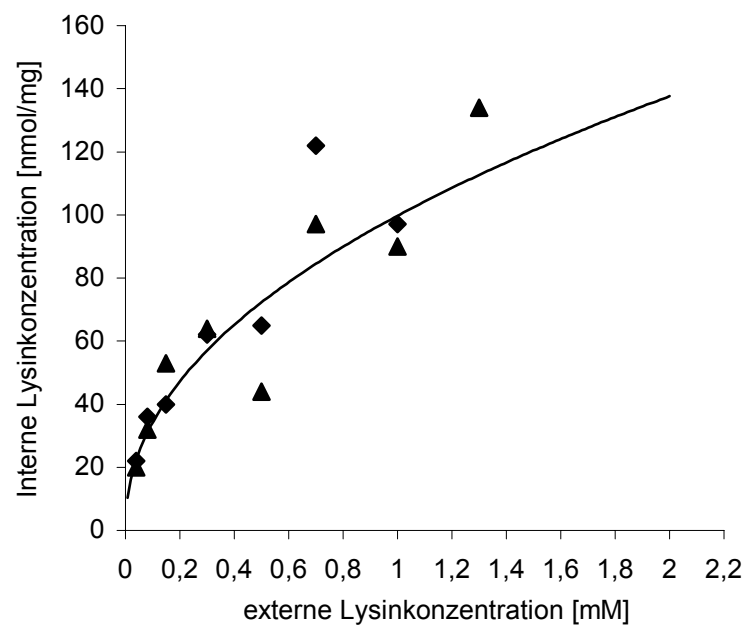


Abbildung 3.17 Akkumulation von Lysin in vakuoläre Vesikel in Abhängigkeit von der externen Substratkonzentration. Messreihe 1 (◆), Messreihe 2 (▲).

Um die Daten direkt miteinander vergleichen zu können, wurde in Abb. 3.17 die vesikelinterne Substratkonzentration in [nmol/mg] gegen die externe Konzentration in [mM] aufgetragen. Die bisherigen Daten des Lysineffluxes zeigten, dass unter den gegebenen Bedingungen, d.h. Verdünnung der beladenen Vesikel ohne Substrat aber unter Zusatz von 1,5 mM ATP, ein Ausgleich der Substratkonzentration zwischen innen und außen erfolgte. Da im Rahmen des Substrateffluxes aus der Vakuole unter Stickstoffmangel insbesondere Arginin eine wichtige Rolle zugesprochen wird, wurden Versuche mit dieser Aminosäure durchgeführt.

3.4.2 Argininefflux

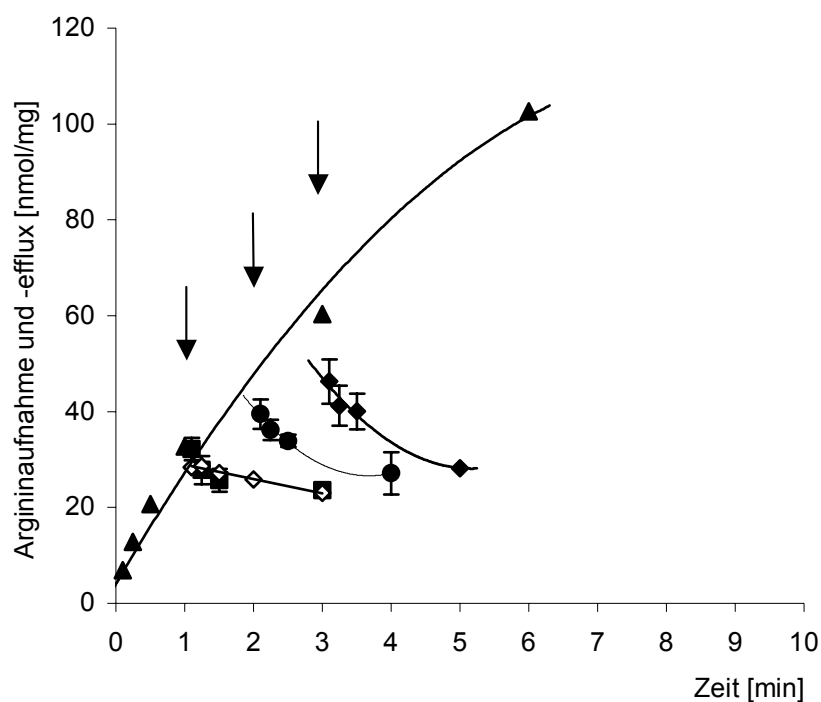


Abbildung 3.18 Argininefflux unter verschiedenen Bedingungen. Die Beladung erfolgte bei 1 mM Substrat (\blacktriangle). Zu den markierten Zeitpunkten wurde der Efflux durch Verdünnung 1:20, bzw. 1:40 gestartet. 1 Minute 1:20 (\blacksquare), 1 Minute 1:40 (\blacklozenge), 2 Minuten 1:20 (\bullet), 3 Minuten 1:20 (\blacklozenge).

In Abb. 3.18 ist wiederum die Aufnahme von Arginin bei 1 mM zur Verdeutlichung der erwarteten internen Konzentration bei Start des Effluxes mit dargestellt. Nach einer Minute Beladungszeit wurde einmal 20fach und einmal 40fach verdünnt, entsprechend lag die externe Substratkonzentration bei Efflux 0,05 mM bzw. 0,025 mM vor. Es fand ein nur minimaler Efflux statt, der zwischen den beiden Ansätzen nicht zu differenzieren war. Nach 1, 2 und 3 Minuten Beladung wurde der Efflux durch 20fache Verdünnung gestartet. Die zunehmenden

Geschwindigkeiten des Effluxes in Abhängigkeit von der internen Konzentration sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

Tabelle 3.4 Efflux von Arginin bei unterschiedlichen internen Konzentrationen nach 20facher Verdünnung

Aufnahme [min]	Arg intern [nmol/mg]	Arg extern [mM]	v [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]
1	31	0,05	4
2	42	0,05	18
3	59	0,05	36

Die Geschwindigkeit des Effluxes stieg nach längerer Beladungszeit und jeweils gleicher Verdünnung (1:20) an, entsprechend den Ergebnissen des Lysineffluxes (s. Abb. 3.15). Um erkennen zu können, ob ausschließlich der Efflux, oder parallel noch eine Substrataufnahme, bzw. Austausch stattfand, wurde ein Experiment mit einer Doppelmarkierung durchgeführt (s. Abb. 3.19). Nach der Verdünnung wurde so, parallel zu dem Efflux mit Hilfe von ³H-Arginin, der Substratgentausch nach Verdünnung mit Hilfe von ¹⁴C-Arginin detektiert.

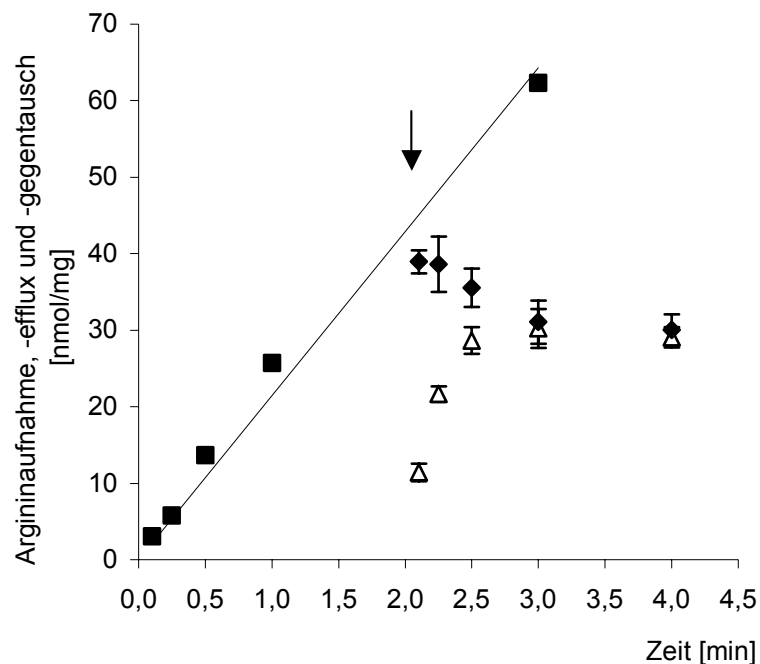


Abbildung 3.19 Argininaustausch und -efflux: die Vesikel wurden zwei Minuten mit ³H-markiertem Substrat bei 1 mM Arginin vorbeladen. Die Verdünnung erfolgte zu dem markiertem Zeitpunkt (2 Minuten) unter Zusatz von ¹⁴C ohne markiertes Substrat. Durch die Verdünnung wurde der Efflux von ³H-Arginin und gleichzeitig die Aufnahme von ¹⁴C-Arginin bei 0,05 mM gestartet. Für eine optimale Messung wurde eine 8fach höhere spezifische Radioaktivität von ³H gegenüber der von ¹⁴C eingesetzt. Argininaufnahme bei 1 mM (■), Efflux bei 0,05 mM (◆), Substratgentausch bei 0,05 mM (Δ).

Mit ³H-Arginin wurde eine Nettoefflux von Substrat nach der Verdünnung gemessen, während ¹⁴C-Arginin im Modus des energieunabhängigen Substratgentausches mit dem internen

Arginin in die Vesikel gelangt ist. Dieser Substratgegenaush bei 0,05 mM externem Arginin erfolgte mit etwa gleicher Rate wie die Nettoaufnahme bei 1 mM.

3.4.2.1 Abhängigkeit des Arginin Effluxes von der externen ATP Konzentration

Eine Abhängigkeit der Effluxgeschwindigkeit von der externen ATP Konzentration, wie Roos *et al.*, (1997) sie in *P. cyclopium* beobachteten, wurde in weiteren Experimenten mit Arginin untersucht. Es wurde Efflux von Arginin bei 0,2 mM ATP und 0,075 mM ATP gemessen und mit der Effluxgeschwindigkeit bei 1,5 mM ATP verglichen. In einem Vorversuch wurde indirekt getestet, ob das elektrochemische Potential über der vakuolären Membran durch die erniedrigten ATP Konzentrationen eingeschränkt war. Eine zu geringe-ATP Konzentration verhindert die Generierung eines maximalen elektrochemischen Potentials. Infolgedessen wird die energieabhängige Aufnahme von Substrat in die Vesikel vermindert. Um einen möglichen Effekt auf den Substratefflux infolge eines zu niedrigen Potentials auszuschließen, wurde bei den oben genannten ATP-Konzentrationen zunächst die Aufnahme von Substrat gemessen.

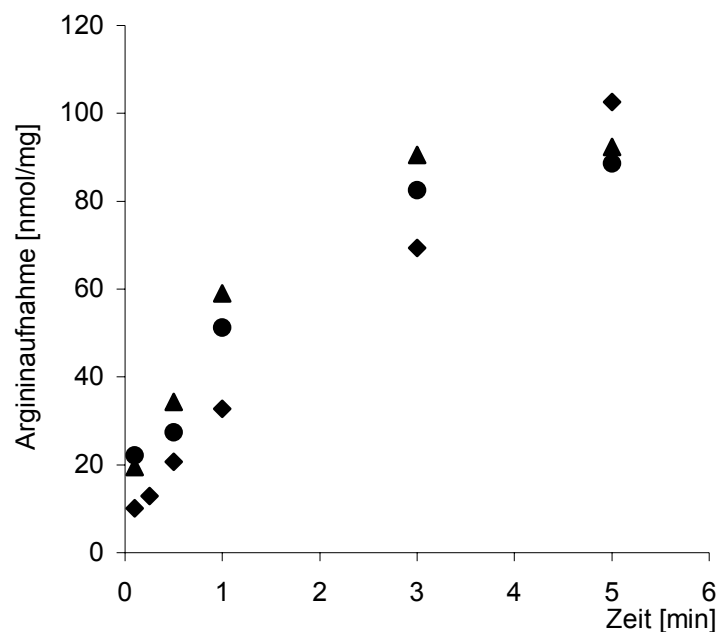


Abbildung 3.20 Argininaufnahme bei 1mM Substrat und verschiedenen ATP Konzentrationen. 0,075 mM ATP (●), 0,15 mM ATP (▲), 1,5 mM ATP (◆).

Die energieabhängige Aufnahme von Substrat zwischen 0,075 mM und 1,5 mM ATP war identisch, daher wurde davon ausgegangen, dass das elektrochemische Potential bei diesen ATP-Konzentrationen nicht eingeschränkt war. Für den Efflux wurden die Vesikel bei 1 mM ATP beladen. Gestartet wurde an den in Abb. 3.21 (nach zwei Minuten) und Abb. 3.22 (nach drei

Minuten) markierten Zeitpunkten durch Verdünnung des Ansatzes. Jeweils nach zwei und nach drei Minuten Beladung wurde die ATP-Konzentration im Verdünnungsvolumen so eingestellt, dass der Efflux bei 1 mM ATP, 0,2 mM ATP und 0,075 mM ATP erfolgte.

Zur Abschätzung der erwarteten internen Substratkonzentration nach Start des Effluxes, wurde eine Aufnahmemessung bei 1 mM Substrat in den Grafiken mit dargestellt.

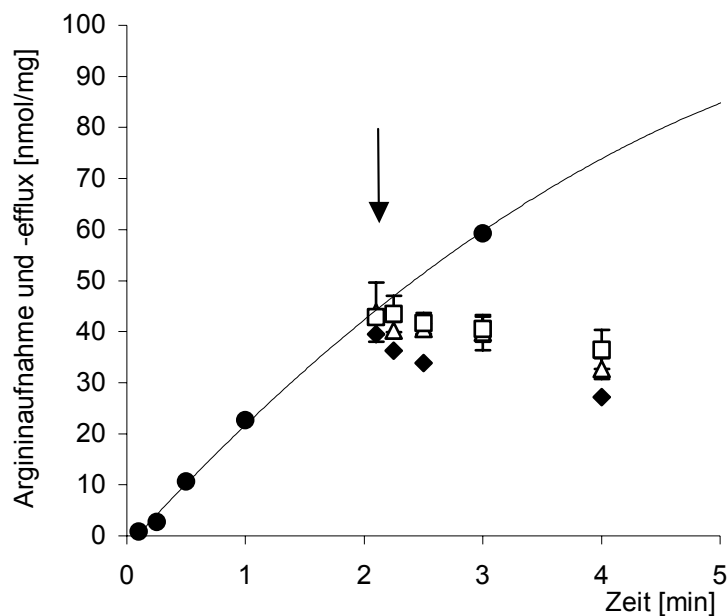


Abbildung 3.21 Efflux von Arginin bei verschiedenen ATP Konzentrationen. Der Efflux wurde zu dem markierten Zeitpunkt gestartet (zwei Minuten). Dargestellt sind die Aufnahme bei 1 mM Arginin (●), Efflux bei 1 mM ATP (◆), Efflux bei 0,075 mM ATP (Δ), Efflux bei 0,2 mM ATP (□).

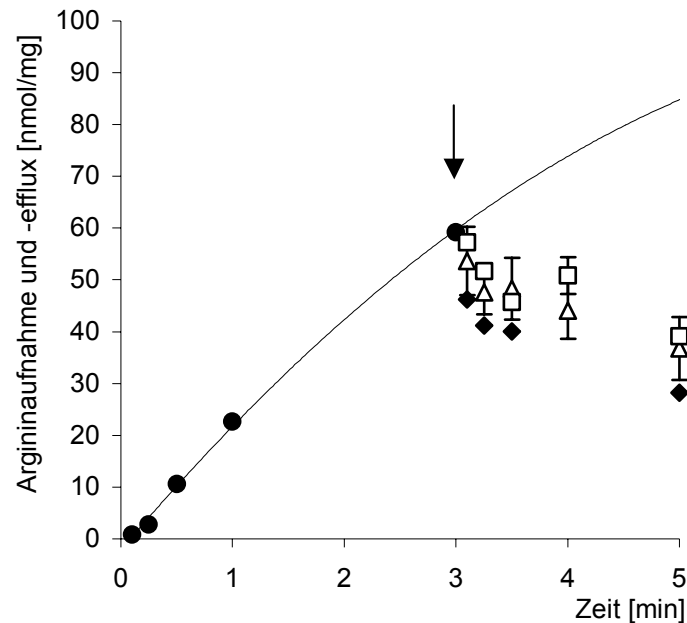


Abbildung 3.22 Efflux von Arginin bei verschiedenen ATP Konzentrationen nach drei Minuten Beladung bei 1 mM Arginin. Aufnahme bei 1 mM Arginin (●), Efflux bei 1 mM ATP (◆), Efflux bei 0,075 mM ATP (Δ), Efflux bei 0,2 mM ATP (□).

Die Geschwindigkeiten des Effluxes bei verschiedenen ATP Konzentrationen wurden in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Tabelle 3.5 Argininefflux bei verschiedenen ATP-Konzentrationen

Beladung (min)	Arg intern (nmol/mg)	v (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) bei 1 mM ATP	v (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) bei 0,2 mM ATP	v (nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹) bei 0,075 mM ATP
2	42	20	3	3
3	60	44	34	34

Nach zwei Minuten Beladung der Vesikel mit Arginin wurde nach einer 20fachen Verdünnung unter Zusatz von 1 mM ATP ein Nettoverlust von Substrat detektiert. Wurde das Verdünnungsvolumen nach zwei Minuten Beladung so eingestellt, dass zum Start des Effluxes die ATP-Konzentration bei 0,2 mM lag, wurde ein verlangsamter, deutlich vom Efflux bei 1 mM abgrenzbarer Substratverlust gemessen. Eine solche Abnahme der Effluxgeschwindigkeit war ebenfalls bei weiterer Erniedrigung der ATP-Konzentration auf 0,075 mM zu erkennen, von der bei 0,2 mM ATP aber nicht zu differenzieren (s. Abb. 3.21). Nach drei Minuten Beladung war der gleiche Effekt zu erkennen, wie nach zwei Minuten: bei 1 mM ATP lag ein schnellerer Efflux vor, als bei 0,2 mM und 0,075 mM ATP (s. Abb.3.22). Insgesamt waren die Effluxgeschwindigkeiten nach drei Minuten im Vergleich zu den analogen Ansätzen nach zwei Minuten Beladungszeit beschleunigt. Roos *et al.* (1997) beobachteten eine Verminderung des Effluxes bei Erniedrigung der ATP-Konzentration. Bei weiterer Erniedrigung auf 0,1 mM ATP wurde dort eine Wiederanstieg der Effluxgeschwindigkeit auf die ursprüngliche Rate detektiert.

3.5 Präparation nach limitierten Wachstumsbedingungen

Eine Funktion der Vakuole ist die Speicherung von insbesondere basischen Aminosäuren. Arginin, Lysin und Ornithin liegen, nach aktivem Transport in die Vakuole, dort zu über 90 % der Gesamtmenge vor (Wiemken & Dürr, 1974; Dürr *et al.*, 1975; Messenguy *et al.*, 1980). Eine wichtige physiologische Rolle vakuolärer Aminosäurepools bei der Stickstoffregulation, insbesondere unter Stressbedingungen, wurde diskutiert (Kitamoto *et al.*, 1987; Klionsky *et al.* 1990). In *S. cerevisiae* wurde unter Stickstofflimitation eine Mobilisierung von Arginin aus dem vakuolärem Pool beobachtet (Kitamoto *et al.*, 1988; Messenguy *et al.*, 2000). Kitamoto *et al.*, (1987) postuliert in *S. cerevisiae* einen Austausch von vakuolärem Arginin mit Kaliumionen aus dem Cytoplasma unter Stickstoffmangelbedingungen. Die unter Stickstoffstress erfolgende Mobilisierung von Arginin, das in der Vakuole eine Konzentration von 0,4 M erreichen kann (Kitamoto *et al.* 1987), zeigt die Notwendigkeit eines regulierten bidirektionalen Flusses von Arginin zwischen Cytoplasma und Vakuole. In *in vitro* Systemen wurden vakuoläre Aufnahmesysteme von Zellen, die unter normalen Wachstumsbedingungen angezogen wurden, bereits charakterisiert (Boller *et al.*, 1975; Oshumi *et al.*, 1981; Sato *et al.*, 1984), während unter Mangelbedingungen keine Daten über den Transport von Substraten in die Vakuole bekannt sind. Kinetische Parameter bezüglich der Substrataufnahme vakuolärer Vesikel aus stickstofflimitierten im Vergleich zu Vesikeln aus nicht limitiert gewachsenen Zellen sollten weitere Hinweise auf die Regulation der Kompartimentierung von Aminosäuren liefern. Dafür musste eine Präparation vakuolärer Vesikel aus stickstofflimitierten Zellen gewonnen werden. Da unter Stressbedingungen in *S. cerevisiae* autophagische Prozesse eingeleitet werden an denen die Vakuole maßgeblich beteiligt ist (Scott *et al.*, 1996; Oshumi, 1997), musste die Präparation optimiert werden.

Bei einem Stickstoffstress von 3 Stunden war eine Isolierung vakuolärer Vesikel nicht möglich, da die Fraktion nach dem ersten Flotierungsschritt sehr viskos war und sich nicht isolieren ließ. Eine nach 1,5 Stunden Stickstoffstress durchgeführte Präparation war ebenfalls in Viskosität und Farbe verändert. Diese Vesikel waren aber energetisierbar. Die Substrataufnahme von Phenylalanin zeigte, dass sowohl die Initialaktivität, als auch die Akkumulation des Substrats erniedrigt waren. Bei einem spezifischen, das Transportsystem betreffenden regulatorischen Effekt wäre eine eine veränderte Initialaktivität bei gleicher Akkumulation oder umgekehrt zu erwarten gewesen. Die Dauer der Stickstofflimitation wurde auf 45 Minuten herabgesetzt. Die isolierten Vesikel besaßen optisch, bezüglich Farbe und Viskosität, die gleiche Qualität der Präparation nach normalen Wachstumsbedingungen. Die nach 45 Minuten Stickstofflimitation präparierten Vesikel ließen sich energetisieren.

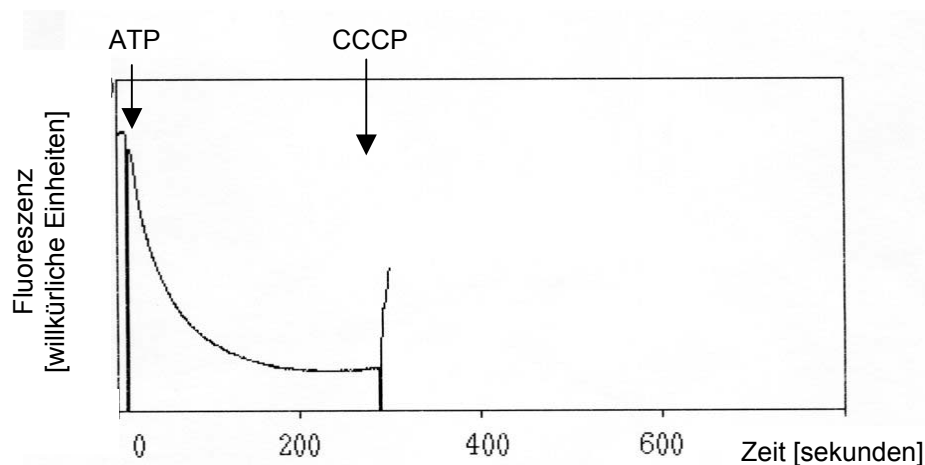


Abbildung 3.23 Energetisierung vakuolärer Vesikel, die aus Zellen nach 45 Minuten Stickstofflimitation isoliert wurden. Zu den markierten Zeitpunkten wurde 1,5 mM ATP zum Start der Energetisierung, bzw. 4 μ M CCCP zur Aufhebung des Membranpotentials, zugegeben.

Um einen Überblick über die Qualität der Präparation im Vergleich zu der nicht limitierter Zellen zu erhalten, wurde das Leitenzym der Vakuole, die Aminopeptidase B, gemessen. Die Gesamt- und die Spezifische Aktivität im Lysat und in der Vesikelfraktion sind in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 3.6 Vergleich der Dipeptidylaminopeptidase B im Lysat und in der Vesikelpräparation aus limitierten (CBS-N) und nicht limitierten (CBS) Zellen. Angegeben sind die Gesamt- [nmol/min] und die Spezifische Aktivität [nmol·mg⁻¹·min⁻¹].

Präparation	Gesamtaktivität [nmol/min]		Spezifische Aktivität [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]	
	Lysat	Vesikel	Lysat	Vesikel
CBS	13,8	0,8	0,4	7,6
CBS-N	24,3	1,4	0,7	4,9

Die Ausbeute vakuolärer Vesikel aus dem Lysat der Zellen lag in beiden Fällen bei ca. 6 % (Die Gesamtaktivität im Lysat wurde gleich 100 % gesetzt). Die Gesamtaktivität im Lysat und in den Vesikeln war nach 45 Minuten Stickstofflimitation (CBS-N) um den Faktor 1,8 höher im Vergleich zur Präparation aus Zellen ohne Limitierung (CBS). Die Anreicherung der Leitenzymaktivität in der Präparation aus Zellen ohne Limitation war 20fach, die nach Stickstoffhunger 7fach. Die Daten werden unter 4.1.3 diskutiert.

Die Kontrolle der Transportkompetenz erfolgte mit Arginin:

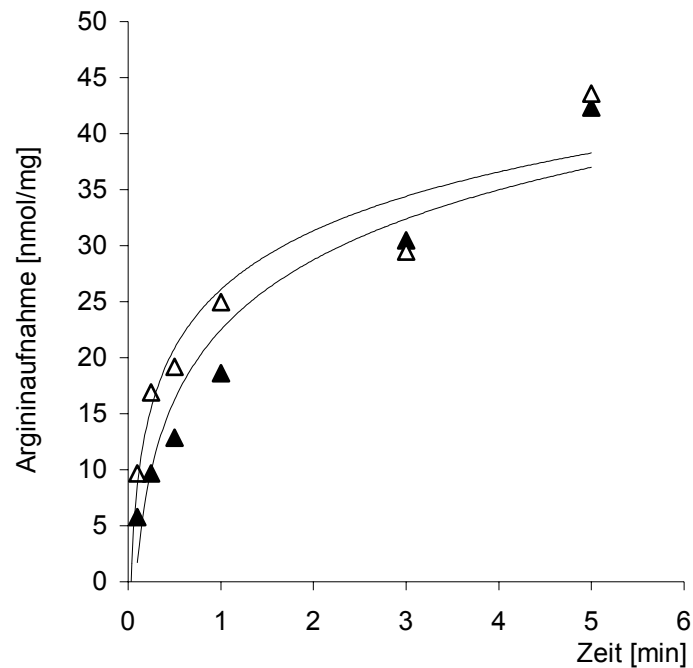


Abbildung 3.24 Aufnahme von Arginin in Vesikel nicht limitierter Zellen (Δ) und in Vesikel, die aus Zellen nach 45 Minuten Stickstofflimitation isoliert wurden (\blacktriangle).

Die Vesikel zeigten bei 0,5 mM Arginin im Vergleich eine ähnliche spezifische Aktivität und akkumulierten gleich viel Substrat. Mit diesen Vesikeln wurden kinetische Daten der Argininaufnahme bestimmt.

3.5.1. Substrataufnahme vakuolärer Vesikel stickstofflimitierter und nicht limitierter Zellen

Kinetische Daten vakuolärer Vesikel präpariert nach normalem Wachstum und nach 45 Minuten Stickstofflimitation wurden gemessen, um möglicherweise regulatorisch veränderte Parameter im Rahmen der Anpassung der Zelle an die Limitation abzuklären. Diese Werte wurden mit Arginin gewonnen, dessen wichtige Rolle unter Stickstofflimitation diskutiert wird.

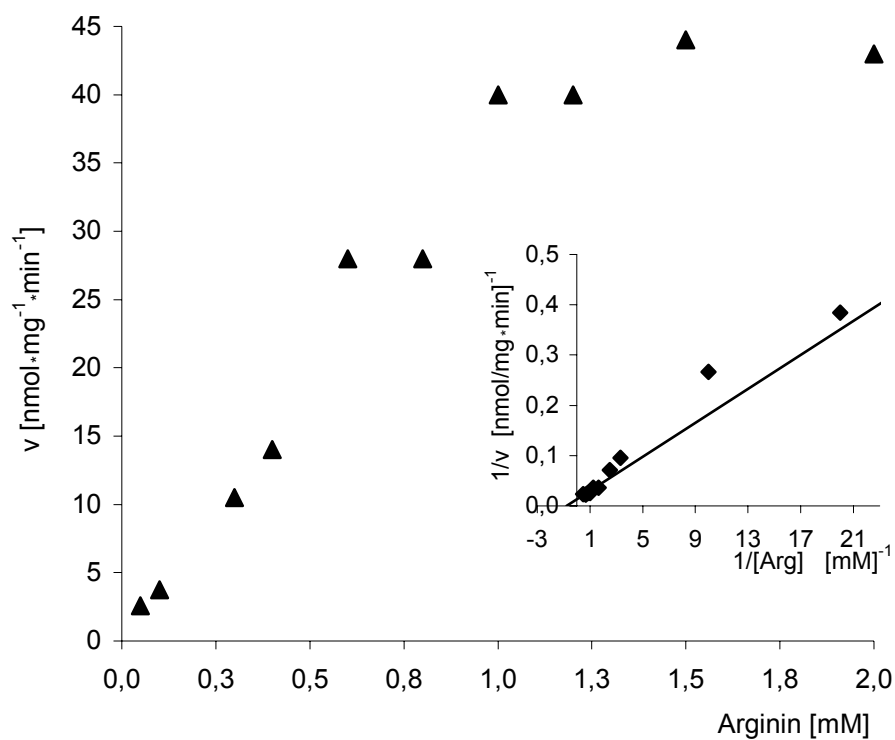


Abbildung 3.25 Argininaufnahme in Vesikel normal gewachsener Zellen. v ist die Aufnahmerate [nmol·mg⁻¹·min⁻¹]. Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Darstellung.

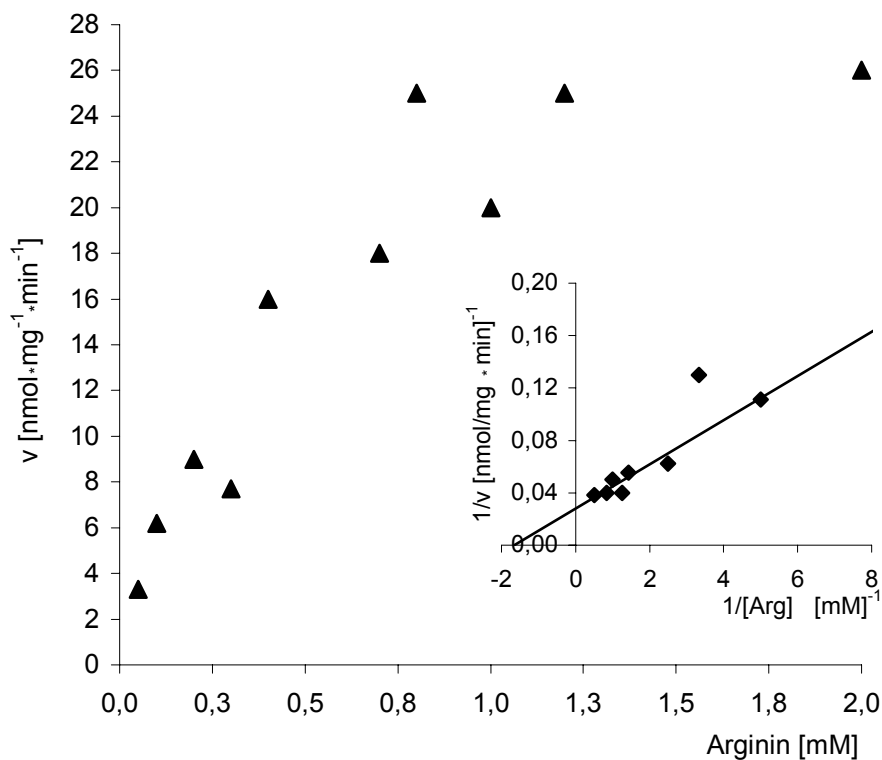


Abbildung 3.26 Argininaufnahme in Vesikel stickstofflimitierter Zellen. v ist die Aufnahmerate [nmol·mg⁻¹·min⁻¹]. Michaelis-Menten und Lineweaver-Burk Darstellung.

Die mit Hilfe eines Computerprogrammes (Origin) berechneten K_t - und V_{\max} -Werte wurden in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

Tabelle 3.7 K_t und V_{\max} der Argininaufnahme in vakuoläre Vesikel aus stickstofflimitierten und nicht limitierten Zellen

Vesikel	K_t [mM]	V_{\max} [nmol·mg ⁻¹ ·min ⁻¹]
+ N	1,3±0,5	79,7±15,6
- N	0,6±0,2	35±4,8

Der K_t der Argininaufnahme in Vesikel nicht limitiert gewachsener Zellen lag bei 1,3 mM, der V_{\max} -Wert bei 80 nmol·mg⁻¹·min⁻¹. Beide Parameter waren nach 45 Minuten Stickstofflimitation verändert und lagen bei 0,6 mM und 35 nmol·mg⁻¹·min⁻¹.

3.6. Proteomanalyse vakuolärer Vesikel

Das Proteom ist die Gesamtheit aller Proteine in einem definierten Status der Zelle. Es ist im Gegensatz zum statischen Genom der Zelle dynamisch. Daher bietet dessen Analyse zu verschiedenen Zellstadien oder unter verschiedenen Wachstumsbedingungen die Möglichkeit, die Auswirkung der Regulation der Zelle auf die beteiligten Proteine gleichzeitig zu erfassen. Die Analyse des Proteoms kann durch die Technik der zweidimensionalen Gelelektrophorese (2-DE) erfolgen, die zu einer hohen Auflösung der Proteine anhand ihres charakteristischen isoelektrischen Punktes und ihres Molekulargewichtes führt. Bei der gezielten Untersuchung von Zellkompartimenten ist die Anreicherung der interessierenden Organellen ein wichtiger Schritt, um auch gering abundante Proteine in der 2-DE detektieren zu können (Peng und Gygi, 2001; Santoni *et al.*; 2000, Wilkins *et al.*, 1998). Die Voraussetzung hierfür war mit der durchgeführten Isolierung vakuolärer Membranen gegeben. Dem Problem der Trennung hydrophober Proteine, die aus verschiedenen Gründen zur Präzipitation in der ersten Dimension neigen, sollte durch Optimierung der Probenvorbereitung begegnet werden. Im Rahmen dieser Arbeit schloss sich an die 2-D Elektrophorese eine Identifizierung der Proteine an. Dafür wurden die aus dem Gel ausgeschnittenen Proteine einer In-Gel-Proteolyse unterworfen und mit Hilfe von MALDI-TOF-MS charakteristische *fingerprints* erstellt. Durch Datenbanksuche wurden die Proteine anhand dieser *fingerprints* identifiziert.

Bevor ein Vergleich der Proteinmuster vakuolärer Membranen zwischen normalen und stickstofflimitierten Wachstumsbedingungen der Zellen vorgenommen wurde, wurden zunächst Spots des Gels vakuolärer Membranen nicht limitierter Zellen analysiert, um einen Überblick über die präsenten Proteine zu erhalten.

3.6.1. Optimierung der Probenvorbereitung

Um eine Abreicherung von Lipid in der vakuolären Fraktion zu erreichen und so die Kapazität des Lysispuffers, in dem die Proteine in Lösung gebrachte wurden, zu erhöhen, wurden diese mit TCA gefällt. Die Zusammensetzung des Lysispuffers war einer der wichtigsten Aspekte dieses Teils der Arbeit, da die Auftrennung insbesondere von Membranproteinen in der 2-D Elektrophorese aufgrund ihrer Hydrophobizität und ihrer daraus resultierenden niedrigen Löslichkeit und Anfälligkeit zur Präzipitation ein kritischer Schritt ist (Molloy 1998).

In diesem Zusammenhang wurden Dithiothreitol (DTT) und Tributylphosphin (TBP) als Reduktionsmittel, sowie Chaps, *sulfobetaine surfactants* (SB) 3-10 und SB 3-12 als Detergenzien, in unterschiedlicher Zusammensetzung getestet. Vorteilhaft an der Verwendung von Tributylphosphin als ungeladenes Reduktionsmittel ist, dass die reduzierenden Bedingungen während der ersten Dimension aufrecht erhalten werden, da es während der isoelektrischen Fokussierung im elektrischen Feld nicht wandert (Herbert *et al.*, 1998). Ein Nachteil besteht in dem Umgang mit dieser Substanz, der aufgrund der hohen Reaktivität unter Schutzgas erfolgen muss. Vor allem die Reproduzierbarkeit der Gele betreffend, erwies sich die Verwendung von 75 mM DTT als geeigneter gegenüber 2 mM Tributylphosphin. Die Verwendung von SB 3-12 im Lysispuffer statt des standardmäßig gebrauchten Chaps erzielte im Rahmen dieser Arbeit die besseren Ergebnisse, obwohl die Konzentration des Detergenzes relativ gering sein musste: Harnstoff liegt in hohen Konzentrationen, wie sie hier generell verwendet wurden, in geordneten Strukturen vor. An diese lagern sich die hydrophoben Ketten des Detergenzes an, was deren Löslichkeit erniedrigt und leicht zu einer Ausfällung des Gesamtkomplexes führt. Daraus resultiert dann auch eine Erniedrigung der Harnstoffkonzentration. Die Konzentration von SB 3-12 lag daher bei maximal 0,5 %. Auf die Verwendung von Bromphenolblau wurde verzichtet, um die Salzkonzentration im Lysispuffer nicht unnötig zu erhöhen.

3.6.2. Zweidimensionale Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Präparation vakuolärer Vesikel durch die 2-D Elektrophorese ergab reproduzierbare Proteinmuster mit etwa dreihundert distinkten Spots. Die Fokussierung der Proteine in den 2-D Gelen beider Vesikelpräparationen war sehr gut.

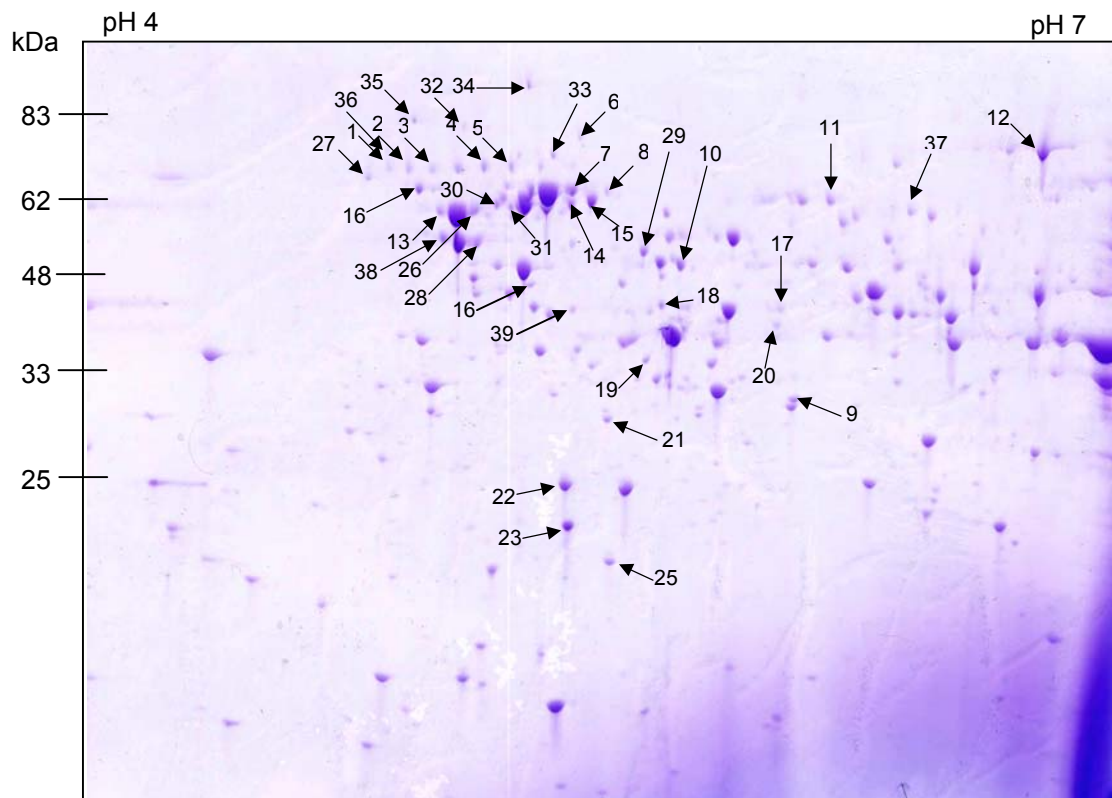


Abbildung 3.27 2-D Gel nach TCA Fällung einer vakuolären Membranpräparation von Zellen, die unter Normalbedingungen angezogen wurden (CBS-Gel). Aufgetragen wurden 400 µg Protein. Die Anfärbung erfolgte mit *Coomassie Brilliant Blue*

Die Identifizierung der Proteine, die nach Anfärbung mit *Coomassie Brilliant Blue* detektiert wurden, erfolgte durch massenspektrometrische Analyse. Jedes Protein zeigt nach Proteolyse ein charakteristisches Muster von Peptidfragmenten. Die Masse der Peptide wurde durch MALDI-TOF-MS (*matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight*) bestimmt. Dafür wurde die Probe mit einem Überschuss an Matrix (α -Cyano-4-Hydroxymizsäure) gemischt, die mit den Analytmolekülen kokristallisiert. Die Matrix absorbiert bei der Wellenlänge des Laserstrahls Energie und transferiert diese auf die im Kristall eingeschlossenen Probenmoleküle. Die Absorption der Laserenergie führt zu Verdampfung der Matrix, wodurch die Analytmoleküle in die sogenannte Gasphasen-Wolke (MALDI-*plume*) mitgerissen werden. Durch Protonentransferreaktionen in der Gasphase werden die Analytmoleküle, meist durch

einfache Protonierung, ionisiert und in einem angelegten elektrischen Feld unter Vakuum beschleunigt. Da die Geschwindigkeit der Ionen in Abhängigkeit von ihrer Ladung, der Beschleunigungsenergie und ihrer Masse ist, kann bei konstanter kinetischer Energie und einfacher Ladung der Ionen, wie sie bei dieser Ionisierung vorwiegend vorliegt, von der Flugzeit direkt auf ihre Masse geschlossen werden. Leichtere Ionen fliegen im elektrischen Feld schneller und erreichen den Detektor entsprechend eher als schwere Ionen, wodurch ein charakteristisches Zeitspektrum des Peptidgemisches aufgenommen werden kann. Durch die Messung der Flugzeit bekannter Ionen kann das aufgenommene Zeit- in Form eines Massenspektrums dargestellt werden (C. Dass, 2001). Die in Abb. 3.27 gekennzeichneten Spots wurden im Rahmen des *Screenings* identifiziert und sind in der Tabelle 3.8 aufgelistet.

Tabelle 3.8 Identifizierte Proteine der vakuolären Vesikelpräparation aus nicht limitierten Zellen, nach Auftrennung durch 2-D Elektrophorese

Spot Nr.	Protein	Name, Beschreibung	Lokalisierung
1	Stv1p	Hydrolase; Untereinheit des V ₀ Komplexes der V-ATPase nicht vakuolärer Organellen; integrales Membranprotein	Golgi-Apparat
2	Uso1p	Vesikulärer Transport, <i>docking</i> Protein; peripheres Membranprotein	Golgi-Apparat
3	Vps5p	Vesikulärer Transport, vakuoläres <i>sorting</i> , Rezeptorprotein	Endosomale Vesikel
4	Vma1p	Untereinheit A der V-ATPase; V ₁ -Komplex	Vakuole
5	Ape3p	Aminopeptidase Y; löslich	Vakuole
6	Sac2p	Vesikulärer Transport; peripheres Membranprotein	Golgi-Apparat
7	Pho8p	Alkalische Phosphatase; integrales Membranprotein	Vakuole
8	Ypl030wp	Protein unbekannter Funktion	nicht lokalisiert
9	Sam1p	S- Adenosylmethionin Synthetase 1; AS- Metabolismus	nicht lokalisiert
10	Gdh3p	Glutamat Dehydrogenase	Cytoplasma
11	Leu4p	Isopropylmalat Synthase; AS Metabolismus, Leucin Biosynthese; löslich	Cytoplasma
12	Met6p	Homocystein Methyltransferase	Cytoplasma
13	Hsp60p	Hitzeschockprotein; löslich	Mitochondrien
14	Erg6p	S-Adenosylmethionin- δ -24-Sterol-C-Methyltransferase; Lipidstoffwechsel, vesikulärer Transport; integrales Membranprotein	<i>lipid particles</i>
15	Ssb1p	Hitzeschockprotein der HSP70 Familie; löslich	Cytoplasma
16	Ssa2p	Chaperon der HSP 70 Familie; löslich	Cytoplasma
17	Erg6p	S-Adenosylmethionin- δ -24-Sterol-C-Methyltransferase;	<i>lipid particles</i>
18	Erg6p	Lipidstoffwechsel, vesikulärer Transport; integrales	
19	Erg6p	Membranprotein	
20	Ylr057wp	Protein unbekannter Funktion; (geringer Score)	nicht lokalisiert
21	Rpt4p	Mitglied der AAA Familie der ATPasen; Komponente der regulatorischen 19S Untereinheit des 26S Proteasom Komplexes	Cytoplasma
22	Snx4p	Putatives Nexin <i>sorting</i> Protein; Proteinabbau, vesikulärer Transport	Endosomale Vesikel
23	Vma4p	Untereinheit E der V-ATPase; V ₁ -Komplex,	Vakuole
24	Lys9p	Saccharopin Dehydrogenase (7. Schritt der Lysin Biosynthese)	Cytoplasma

Fortsetzung von Tabelle 3.8

25	Rho2p	GTP bindendes Protein/ GTPase;periph. Membranprot.	Golgi-Apparat
26	Hsp60p	Hitzeschockprotein; löslich	Mitochondrien
27	Kar2p	Hydrolase; löslich	ER
28	Vma2p	Untereinheit B der V-ATPase; V ₁ -Komplex	Vakuole
29	Dld2p	Lactat Dehydrogenase; löslich	Mitochondrien
30	Vma1p	Untereinheit A der V-ATPase; V ₁ -Komplex	Vakuole
31	Vma1p	Untereinheit A der V-ATPase; V ₁ -Komplex	Vakuole
32	Cdc48p	Mitglied der AAA Familie der ATPasen; Proteinabbau, Membranfusion; löslich	Cytoplasma
33	Ape3p	Aminopeptidase ; löslich	Vakuole
34	Por1p	Spannungsabhängiger, anionenselektiver Kanal; integrales Membranprotein	Mitochondrien
35	Ylr222cp	Protein unbekannter Funktion	nicht lokalisiert
36	Vps13p	Protein beteiligt an vakuolärem Sorting; vesikulärer Transport, Membranfusion	nicht lokalisiert
37	Vtc4p	<i>vacuolar transporter chaperon</i> ; Protein involviert in vakuoläre Polyphosphat Akkumulierung; integrales Membranprotein	Cytoplasma
38	Vma2p	Untereinheit B der V-ATPase; V ₁ -Komplex	Vakuole
39	Sam2p	S-Adenosylmethionin Synthetase 2; AS Metabolismus	nicht lokalisiert

In dem Gel waren neben vakuolären Proteinen auch viele, die dem Golgi-Apparat und dem sekretorischen Weg zugeordnet wurden.

Die per Auge detektierten Unterschiede wurden in der Abbildung des Gels dargestellt, das mit einer Vesikelpräparation aus Zellen nach 45 Minuten Stickstofflimitation angefertigt wurde (s. Abb 3.28).

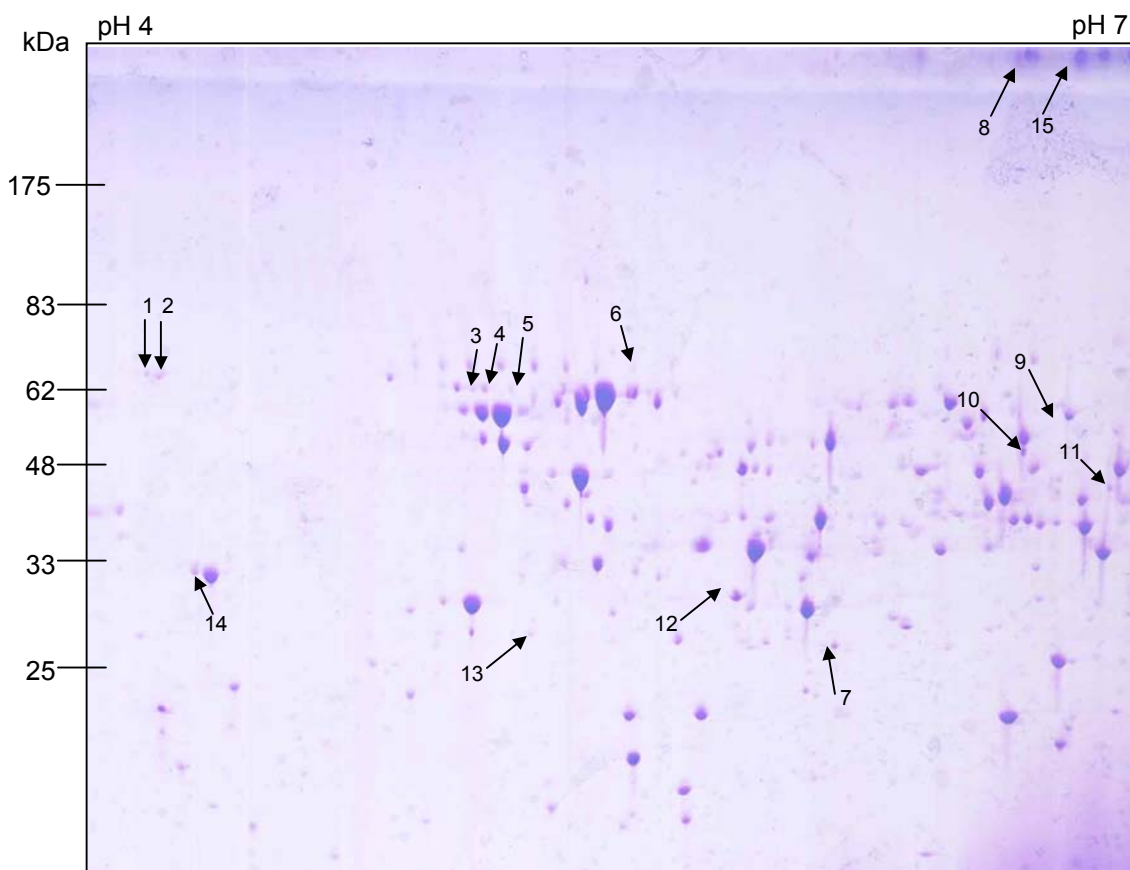


Abbildung 3.28 2-D Gel nach TCA Fällung einer vakuolären Membranpräparation aus stickstofflimitierten Zellen (CBS-N-Gel). Aufgetragen wurden 400 µg Protein. Die Anfärbung erfolgte mit *Coomassie Brilliant Blue*.

Die Pfeile in Abb. 3.28 markieren die Spots, die im Vergleich zum CBS-Gel neu oder verstärkt, bzw. nicht mehr oder abgeschwächt auftraten (s. auch Tabelle 3.9). Die identifizierten Proteine sind in Tabelle 3.9 aufgelistet.

Tabelle 3.9 Identifizierte Proteine vakuolärer Vesikel, präpariert aus stickstofflimitierten Zellen, nach Auftrennung durch 2-DE

Spot Nr	Protein	Name, Beschreibung	Lokalisierung
1 & 2: verstärkt auf CBS-N	Pdi1p	Disulfid Isomerase und Oxidoreductase; löslich	Endoplasmatisches Retikulum
3 & 4: verstärkt auf CBS-N	Cps1p	Carboxypeptidase S; löslich; reprimiert bei guter Stickstoffquelle	Vakuole
5: leicht abgeschwächt auf CBS-N	Vma1p	Untereinheit A der V-ATPase; V ₁ -Komplex	Vakuole
6: abgeschwächt auf CBS-N	Ape3	Amino-peptidase Y; löslich	Vakuole
7: abgeschwächt auf CBS-N	Sam1p	S- Adensylmethionin Synthetase 1; AS- Metabolismus	nicht lokalisiert
8: nur auf CBS-N-Gel detektierbar	Put2p	δ-1-Pyrrolin-5-Carboxylat-DH; Prolin Abbau; löslich	Mitochondrien

Fortsetzung von Tabelle 3.9

9: nur auf CBS-Gel detektierbar		Die Position von Spot 9 entspricht Spot 37 aus Abb. 3.28: Vtc4p war nach Stickstofflimitation nicht mehr zu detektieren	
10: verstärkt auf CBS-N	Lap4p	Aminopeptidase I; löslich	Vakuole
11: wenig verstärkt auf CBS-N	Met17p	O-Acetylhomoserine Sulfhydrylase; AS- Metabolismus; löslich	Cytoplasma
12: abgeschwächt auf CBS-N	Erg6p	S-Adenosylmethionin- δ -24-Sterol-C-Methyltransferase; lipidstoffwechsel, vesikulärer Transport; integrales Membranprotein	lipid particles
13: nur auf CBS-N-Gel	Ccp1p	Cytochrom-C Peroxidase; Zellstress	Mitochondrien
14: wenig verstärkt auf CBS-N	Vma6p	Untereinheit D der V-ATPase; V ₀ -Komplex; integrales Membranprotein	Vakuole
15: verstärkt auf CBS-N	Qcr2p	Ubichinol-Cytochrom-C Reduktase-Core Protein 2; integrales Membranprotein	Mitochondrien

Von insgesamt 54 identifizierten Proteinen beider Gele konnten 40 unterschiedlichen ORFs in der Datenbank zugeordnet werden. Fünf Proteine waren auf dem Gel mehr als einmal präsent. Von den 40 verschiedenen Proteinen waren 9 vakuolär. Die restlichen 31 sind im Cytoplasma (10), in den Mitochondrien (6), im Golgi-Apparat (4) oder in anderen Kompartimenten (5) lokalisiert, während von 6 Proteinen keine Lokalisierung bekannt ist. Mit dem verwendeten Lysispuffer konnten 7 integrale Membranproteine identifiziert werden.

Bei einem Vergleich der beiden Gele von Vesikelpräparationen nicht limitierter und 45 Minuten stickstofflimitierter Zellen wurden Unterschiede festgestellt, die auf die Limitation zurückzuführen waren. Die Proteine werden im Zusammenhang mit der Stickstofflimitation unter 4.2 besprochen.

4. DISKUSSION

Eine zentrale Aufgabe der Vakuole in der Zelle ist die Speicherung verschiedener Metabolite. Der Fluss von Substanzen über die vakuoläre Membran wurde in dieser Arbeit anhand von *in vitro* Studien vakuolärer Vesikel aus *S. cerevisiae* untersucht. Um mögliche Modifikationen der Aufnahmesysteme infolge limitierter Wachstumsbedingungen zu untersuchen, wurden Vesikel aus stickstofflimitierten Zellen präpariert und anhand dieser kinetische Parameter bestimmt. Zusätzlich zu direkten Transportmessungen wurde das vakuoläre Proteinmuster in Hinblick auf eine verstärkte Synthese bzw. Abbau von vakuolären Proteinen nach limitierenden Wachstumsbedingungen der Zellen untersucht.

4.1. Vakuoläre Vesikel aus *S. cerevisiae*

In *S. cerevisiae* wurden vakuoläre Transportvorgänge bereits anhand verschiedener Meßsysteme bearbeitet. Für *in vivo* Studien wurden ganze permeabilisierte Protoplasten verwendet, die eine differentielle Extraktion cytoplasmatischer und vakuolärer Metabolitenpools erlaubten. Die durch polybasische Proteine (Schlenk & Dainko, 1965; Yphantis *et al.*, 1967) sowie durch Cu^{2+} (Ohsumi *et al.*, 1988) hervorgerufene Durchlässigkeit der Plasmamembran für kleine Moleküle wurde zur selektiven Permeabilisierung vergewendet, wobei die Mechanismen der jeweiligen Wirkung nicht bekannt sind. Das polyene Anitibiotikum Nystatin führt zur Bildung von Porenkomplexen mit dem in den Membranen enthaltenen Ergosterol (Bolard, 1986 (a); Bolard, 1986 (b)). Die Selektivität dieser Methode beruht auf dem Ergosterol/Gesamtlipid-Verhältnis, das in der Plasmamembran hoch ist, während Organellenmembranen nur Spuren von Ergosterol enthalten (Zinser *et al.*, 1991; Daum *et al.*, 1998). Für *in vitro* Studien an der vakuolären Membran wurden intakte Vakuolen (Indge, 1967; Wiemken, 1975; Dürr, 1975) verwendet, die unter isoosmotischen Bedingungen durch schonende Lysemethoden präpariert werden konnten. Die Inhomogenität der Größe dieser Organelle in den Zellen erschwert aber die Reinigung und Anreicherung in intakter Form (R. Hecker, I. Bellahn, diese Arbeit). Daher wurden als Grundlage dieser Arbeiten vakuoläre Vesikel verwendet, die reproduzierbar mit hoher Anreicherung und Reinheit präpariert werden konnten. Die Bildung von vesikulären Strukturen aus der vakuolären Membran erfolgte spontan nach der hypotonen Lyse der Protoplasten und Vakuolen. Aufgrund der niedrigen Dichte der Vesikel sowie ihrer "Aggregation" mit sogenannten *lipid bodies* konnte die Reinigung durch Flotierung auf diskontinuierlichen Ficoll 400-Gradienten durchgeführt werden (Roberts *et al.*, 1991). Nach Durchführung einer modifizierten Methode wurde eine Gütebestimmung dieser Präparation durch die Messung von Leitenzymaktivitäten verschiedener Organellen durchgeführt. Dabei

wurde eine hohe Anreicherung vakuolärer, bei starker Abreicherung mitochondrialer Leitenzymaktivitäten detektiert. Insbesondere die Abreicherung von Mitochondrien war wichtig, um verfälschte Ergebnisse infolge mitochondrialer Transportaktivitäten ausschließen zu können. In der vakuolären Präparation konnte die ATPase-Aktivität durch einen spezifischen Inhibitor der V-ATPase, Concanamycin A, gehemmt werden. Eine mitochondriale ATPase Aktivität ließ sich nicht detektieren, wogegen weitere Enzymtests zeigten, dass mitochondriale Proteine in der Präparation vorlagen (s. Tabelle 3.1). Der verwendete spezifische Inhibitor der F_0F_1 -ATPase, Azid, verursacht gleichzeitig eine Aktivierung der V-ATPase (Serrano, 1984). Die Hemmung einer geringfügigen F_0F_1 -ATPase-Aktivität in der vakuolären Präparation könnte durch eine Verstärkung der V-ATPase- Aktivität überlagert gewesen sein. Die Vesikel ließen sich energetisieren, womit die Voraussetzungen für Im- und Exportstudien gegeben waren und es konnten typische Transportereigenschaften wie Substrat- und Proteinabhängigkeit gemessen werden. Bei der Etablierung des Meßsystems wurde eine Auswirkung der Proteinkonzentration auf die Substrataufnahme in vakuoläre Vesikel beobachtet. Ab einer kritischen Konzentration im Testansatz wurde die interne Substratkonzentration nicht so lange konstant gehalten wie bei geringeren Proteinkonzentrationen (s. Abb. 3.5). Berechnungen ergaben, dass das Substrat während der gesamten Messzeit im Überschuss vorlag. Eine Erniedrigung der externen Substratkonzentration infolge der Aufnahmeaktivität der Vesikel konnte also nicht die Ursache für den beobachteten Substratverlust sein. Eine sichere Begründung für diesen Effekt kann nicht gegeben werden.

4.1.1. Polyamintransport

Polyamine nehmen In *S. cerevisiae* auf verschiedene Schritte der RNA-, DNA- und Proteinsynthese Einfluss, daher ist ihr Vorhandensein für das Zellwachstum (Tabor *et al.*, 1982) und die Sporulation essentiell. Nur bei Verfügbarkeit von Polyaminen können Zellen das Killertoxin produzierende RNA Killer Plasmid in der Zelle halten, während Zellen, die das Plasmid nicht enthalten, durch diese Toxine absterben (Tabor *et al.*, 1982). Der Polyamingehalt der Zelle wird durch Biosynthese, Abbau und Transport reguliert (Igarashi *et al.*, 1999). In *E. coli* wurden zwei Aufnahmesysteme, PotD und PotF identifiziert, beides ABC-Transporter der Plasmamembran, die je aus einem periplasmatischem Substratbindeprotein, zwei Transmembranuntereinheiten und einer membranassozierten ATPase bestehen. Für ein drittes System, PotE, wurde die Aufnahme und Exkretion von Putrescin im Austausch gegen Ornithin gezeigt (Kashiwagi *et al.*, 1992). Neue Daten zeigen, dass bei der durch osmotischen Stress induzierten Exkretion von Putrescin PotE nicht involviert ist und infolgedessen ein weiteres System vorhanden sein muss. (Schiller *et al.*, 2000). Für den Polyamintransport über die

vakuoläre Membran wurden verschiedene Proteine in Betracht gezogen. Anhand eines Sequenzvergleiches des *multidrug resistance transporter* aus *B. subtilis* (Blt), der die Exkretion von Spermidin katalysiert (Woolridge *et al.*, 1997), mit dem Hefegenom wurden vier Gene gefunden (Goffeau *et al.*, 1996), die aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit Blt als putative Polyamintransporter vorgeschlagen wurden (*YLL028w*, *YBR180w*, *YKR105c* und *YCR023c*). Hefestämme, die mit den entsprechenden Genen transformiert worden waren, wurden auf Polyamintoxizität und Transportaktivität hin untersucht (Kakinuma *et al.*, 1992). In nicht überexprimierenden Stämmen wurden zwischen einer *YCR028w*-Deletionsmutante und dem Wildtyp keine Unterschiede in der Polyaminaufnahme ganzer Zellen und vakuolärer Vesikel detektiert, entsprechend den Messergebnissen an vakuolären Vesikeln dieser Arbeit. In einem *YLL028w* überexprimierenden Stamm wurde eine erhöhte Aufnahmeaktivität von Polyaminen sowohl in ganzen Zellen als auch in vakuoläre Vesikel festgestellt. Es wurde vermutet, dass der erhöhten Aufnahme in ganze Zellen ein "Sog" zugrunde lag, der durch die verstärkte Transportaktivität in die Vakuole zustande kam und mit der erhöhten Aufnahme aus dem Medium kompensiert wurde. Aufgrund dieser Daten wurde ein vakuolärer Importcarrier für Polyamine vermutet (Tomitori *et al.*, 1999), der nach *transporter for polyamine 1*, mit Tpo1p benannt wurde. Tpo1p besitzt zwölf potentielle Transmembranhelices und wurde in die Gruppe von Transportern der Hefe, die als *major facilitator superfamily* (MFS) (Goffeau *et al.*, 1997) bekannt sind, eingeordnet. In weiterführenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Tomitori wurde anhand von Homologiesuchen des durch *TPO1* codierten Proteins drei weitere Kandidaten gefunden, die ORFs *YGR138c*, *YPR156c*, und *YOR273c*. Hefestämme, die die entsprechenden Gene überexprimierten, zeigten eine erhöhte Resistenz gegenüber Spermin, daher wurden die ORFs mit *TPO2-4* bezeichnet (Tomitori *et al.*, 2001). Im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte vergleichende Aufnahmemessungen an vakuolären Vesikeln eines Deletionsstammes *yll028w::lacZ* und dem Wildtyp zeigten, dass keine Unterschiede der spezifischen Aufnahmeaktivität und der Gesamtaktivität der Polyamine Putrescin und Spermin bestanden. Aufgrund der Lokalisierung des Proteins in der Plasmamembran (M. Albertsen), einer erniedrigten Putrescinexkretion des *yll028w::lacZ*-Stammes aus ganzen Zellen (M. Albertsen) und der gleichen Aufnahmeraten in vakuoläre Vesikel des *yll028w::lacZ*-Stammes und des Wildtyps, wird für Tpo1p ein plasmamembranständiger Polyaminexporter vermutet. Die in der Arbeitsgruppe um Tomitori (1999) detektierten erhöhten Aufnahmeraten für Polyamine in vakuoläre Vesikel waren die Grundlage für die Postulierung eines vakuolären Importcarriers. Die Daten wurden nach Messungen an *TPO1* überexprimierenden Zellen und den daraus präparierten vakuolären Vesikeln gewonnen. Das Überschwemmen der Zelle mit unphysiologisch hohen Mengen eines Proteins kann zu dessen Misslokalisierung in der Zelle führen, infolgedessen könnten veränderte Aktivitäten der Substrataufnahme in vakuoläre

Vesikel gemessen worden sein. Eine Lokalisierung des Proteins wurde in der Arbeitsgruppe um Tomitori nicht durchgeführt.

Die Aminosäuresequenz des ORFs *YCR023c* enthält ein konserviertes Motiv von Polyamintransportern. Vergleichende Aufnahmemessungen von Polyaminen in vakuoläre Vesikel des Deletionsstammes *ycr023c::lacZ* mit dem Wildtyp ergaben keine Unterschiede in der spezifischen und der Gesamtaufnahmeaktivität, wie bei einem vakuolären Aufnahme-carrier zu erwarten gewesen wäre. Die Daten stützen daher nicht die Vermutung, dass das Genprodukt des ORFs *YCR023c* ein Polyamintransporter in der vakuolären Membran ist. Es ist aber auch eine Redundanz denkbar, bei der weitere Carrier in der vakuolären Membran vorhanden sind und möglicherweise bestehende positiven Befunde überdecken.

4.1.2. Efflux von Aminosäuren aus vakuolären Vesikeln von *S. cerevisiae*

Der aktuelle intravakuoläre Gehalt an Aminosäuren wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Die Anreicherung dieser Metabolite resultiert aus der aktiven Aufnahme einzelner Aminosäuren in die Vakuole sowie aus ihrer Funktion als Abbaukompartiment für Proteine. Anhand vakuolärer Vesikel wurden sieben unabhängige Aufnahmesysteme für Aminosäuren, die im Modus H^+ /Aminosäure-Antiport Substrate gegen den Konzentrationsgradienten in der Vakuole akkumulieren sowie ein Arginin/Histidin-Antiporter charakterisiert (Sato *et al.*, 1984). Der spezifische Transport cytoplasmatischer Proteine in die Vakuole erfolgt unter normalen Wachstumsbedingungen über den *cytoplasm to vacuole (Cvt)*-Weg (Bryant & Stevens, 1998). Unter Stickstoffmangel transportiert die Zelle in makroautophagischen Prozessen (Scott *et al.*, 1996) cytoplasmatische Bestandteile in die Vakuole. Hier wird während der Bildung sogenannter Autophagosomen, von einer Doppelmembran umgebene Vesikel, Cytoplasma in diese eingeschlossen und deren Inhalt in die Vakuole aufgenommen, indem ihre äußere mit der vakuolären Membran fusioniert. Die Regulation von Makroautophagie und des konstitutiven *Cvt*-Weges gehen teilweise auf die gleichen Mechanismen zurück (Baba *et al.*, 1997). Für den Abbau von Autophagosomen ist in erster Linie die Aktivität der vakuolären Proteinase B notwendig (Takeshige *et al.*, 1992).

Ein Efflux von basischen Aminosäuren aus der Vakuole wurde bisher nur unter Stickstoffmangel beobachtet (Legerton & Weiss, 1979; Kitamoto *et al.*, 1988; Messenguy *et al.*, 2000). Stickstoffhunger führt zur Sporulation von Hefezellen (Bryant & Stevens, 1998); der gesamte Differenzierungsprozess der Zelle muss über den Abbau vorhandener Proteine bewältigt werden (Takeshige *et al.*, 1992). Daher nutzt die Zelle den in Form von Arginin in der Vakuole gespeicherten Stickstoff und metabolisiert das Substrat in Glutamat, das als Stickstoffdonor für alle Stickstoff-enthaltenden Komponenten der Zelle dienen kann (Magasanik, 1992). Das aus

der Vakuole mobilisierte Arginin wird im Cytoplasma durch die Arginase in Harnstoff und Ornithin gespalten (Jauniaux *et al.*, 1978). Nach Umsetzung des Ornithins zu Prolin wird dieses in die Mitochondrien transportiert und dort zu Glutamat metabolisiert. Die meisten Aminosäuren können als Stickstoffquelle genutzt werden, allerdings gewährleisten, aufgrund ihrer unterschiedlichen Verwertbarkeit, nicht alle eine gleich gute Proliferation der Zelle (Dickinson, 1999). Die oben beschriebene Mobilisierung von Arginin unter Stickstoffmangel wurde in *in vivo* Experimenten durch differentielle Extraktion des Cytoplasmas und des vakuolären Aminosäurepools gezeigt (Kitamoto *et al.*, 1988; Messenguy *et al.*, 2000). Neue Daten liefern Hinweise bezüglich des bislang unbekanntenen Mechanismus des Arginineffluxes. Sagne *et al.*, (2001) charakterisierten einen neuen Aminosäuretransporter (LYAAT-1) in der lysosomalen Membran neuronaler Zellen in Ratten, der für den Export von neutralen Aminosäuren (Alanin und Prolin) aus den Lysosomen in das Cytoplasma verantwortlich ist. Der Export findet durch eine chemiosmotische Koppelung an die H⁺-ATPase dieser Organellen in Form eines H⁺/Aminosäure-Symports statt. Nach Homologiesuche in eukaryotischen Genomen wurde LYAAT-1 phylogenetisch einer Untergruppe der lysosomalen Transporterfamilie der Aminosäure/Auxin-Permeasen zugeordnet (Sagne *et al.*, 2001). An ganzen permeabilisierten Zellen von *Penicillium cyclopium* wurde die Mobilisierung von Aminosäuren aus der Vakuole infolge vielfältiger Signale beschrieben. Die Akkumulation von Aminosäuren in der Vakuole wird als ein dynamischer Äquilibrierungsprozess zwischen aktiver, ATP-abhängiger Aufnahme und energieunabhängigem Efflux beschrieben (Roos *et al.*, 1997). Beobachtet wurden stimulierende und inhibierende Effekte verschiedener extravakuolärer ATP-Konzentrationen sowie eine sigmoidale Abhängigkeit des Effluxes von der intravakuolären Substratkonzentration (Roos *et al.*, 1997). Von der Arbeitsgruppe um Russnak wurden in *S. cerevisiae* sieben Gene mit bislang unbekannter Funktion der entsprechenden Proteine beschrieben, die Homologie zu neuronalen vesikulären GABA-Glycin¹ Transportern aufweisen (s. auch 1.1). Die Sequenzen dieser Proteine, die nach ihrer Charakterisierung Avt (*a*mino *a*cid *v*acuolar *t*ransport) 1-7p benannt wurden, besitzen keine Ähnlichkeit zu den bereits charakterisierten Permeasen, die die Aufnahme von Aminosäuren in die Zelle vermitteln. Avt1-7p wurden auf eine mögliche Beteiligung an vakuolären Aminosäuretransport hin untersucht, wobei ausgeschlossen wurde, dass es sich um die bereits biochemisch charakterisierten spezifischen Aufnahmesysteme der Vakuole für basische Aminosäuren (Sato *et al.*, 1984) handelt. Für drei der Genprodukte von AVT1-7, nämlich Avt3p, Avt4p und Avt6p wurde eine Beteiligung an dem Efflux von Aminosäuren aus der Vakuole in das Cytoplasma gezeigt. Russnak *et al.* (2001) schlägt nach *in vitro* Effluxstudien in *S. cerevisiae* für Avt6p einen aktiven vakuolären Aminosäureexporter vor,

¹ UNC-47 aus *C. elegans* und dessen Homolog der Ratte (VGAT,1) und der Maus (VIAAT,2) bilden die UNC-47/VGAT/VIAAT Familie, die den Transport von γ -Aminobuttersäure (GABA) und Glycin aus dem Cytosol in synaptische Vesikel vermitteln.

der im Modus H^+ /Aminosäure-Symport das durch die V-ATPase generierte elektrochemische Potential nutzt. Dieser Mechanismus wird sowohl von den mit den Avt-Proteinen verwandten Transportern der Familie der Aminosäure/Auxin-Permeasen in der Plasmamembran von Pflanzen (Young *et al.*, 1999), als auch von der nicht verwandten MFS (*major facilitator superfamily*)-Familie der Aminosäure-Permeasen in Bakterien und Hefen (Andre, 1995) genutzt. Avt1p soll den Transport in die Vakuole von *S. cerevisiae* vermitteln, während Avt2p, Avt5p und Avt7p keine Funktion als vakuoläre Aminosäuretransporter zugeordnet werden konnte. Russnak zeigte anhand von Deletionsmutanten, dass der *steady state*-Level von Tyrosin, Glutamin und Isoleucin *in vitro* durch die gegenläufige Aktivität von Avt1p und Avt3/4p zustande kommt.

In dieser Arbeit wurde der Efflux von Aminosäuren anhand des *in vitro* Systems vakuolärer Vesikel untersucht. Die Ergebnisse zeigen an verschiedenen Stellen Ähnlichkeiten zu den bisher veröffentlichten Daten anderer Organismen (vgl. Roos *et al.*, 1997).

Es wurde gezeigt, dass bei einer internen Schwellenkonzentration (Arginin 31 nmol/mg) nach der Verdünnung nahezu kein Efflux stattfand (s. Abb. 3.18: Arginin Efflux nach 1:20 und 1:40 Verdünnung). Bei sukzessiv ansteigender interner Konzentration nahm die Geschwindigkeit des Effluxes zu. Der Substratverlust stagnierte jeweils nach dem Erreichen einer bestimmten internen Konzentration unabhängig von derjenigen, die zu Beginn des Effluxes vorlag (s. Abb. 3.18). Es wurde weiterhin gezeigt, dass bei der Aufnahme von Substrat eine Abhängigkeit der Akkumulationskapazität (nmol/mg Protein) der Vesikel von der externen Substratkonzentration bestand (s. Abb. 3.4 und Abb 3.17). Im Fall von Phenylalanin stieg die interne Substratkonzentrationen (nmol/mg Protein) so lange bei Erhöhung der externen Konzentration an, bis letztere bei 10 mM lag. Bei weiterer Erhöhung der äußeren Konzentration blieb die interne Substratkonzentration konstant. Diese Abhängigkeit der Akkumulation von der externen Substratkonzentration könnte mit der Geschwindigkeit und dem Ausmaß des Effluxes in Beziehung stehen. Die interne Konzentration, bis zu der der Efflux erfolgte, stimmte mit der maximalen Anreicherung von Substrat bei der gegebenen äußeren Substratkonzentration während des Effluxes überein: Lysinefflux bei 0,08 mM externem Substrat erfolgte bis zu einer internen Konzentration von ca. 35 nmol/mg. Die Akkumulation von Lysin bei 0,08 mM Substrat lag ebenfalls bei 35 mol/mg (s. Abb. 3.16). Für den Efflux von Arginin bestand eine analoge Abhängigkeit von einem internen Schwellenwert und dem Substratgradienten über der Membran. Ferner zeigte sich in einem Experiment mit 3H - und ^{14}C -markiertem Arginin, dass während des Effluxes bei einer Konzentration von 0,05 mM der Substratgegentausch parallel zum Efflux mit hoher Rate stattfindet (s. Abb 3.19). Mit Hilfe von CCCP wurde eine Abhängigkeit des Lysineffluxes von dem elektrochemischen Potential untersucht (Abb. 3.13), wobei der Zusatz des Protonophors zu einer deutlichen Beschleunigung des Substratverlustes führte. Diese Daten sind mit der Reversibilität des jeweiligen Aminosäureaufnahmesystems zu

erklären. Die Akkumulation des Substrats gegen das Konzentrationsgefälle wird durch die treibende Kraft des elektrochemischen Potentials erreicht. Durch den Schritt der Verdünnung wird der Substratgradient über der vesikulären Membran erhöht. Dadurch erfolgt ein Nettoexport aus den Vesikeln in das Medium, bei gleichzeitig ablaufendem Gegentausch von Substrat (s. Abb. 3.19), bis sich ein neues Gleichgewicht eingestellt hat. Allerdings ist eine bestimmte vesikelinterne Konzentration notwendig, um einen Efflux in Abhängigkeit des Substratgradienten über der Membran detektieren zu können (s. Abb. 3.18). Bei einer internen Argininkonzentration von 30 nmol/mg Protein wurde nach einer 20fachen Verdünnung ein geringer Efflux detektiert, der von dem nach einer 40fachen Verdünnung nicht zu differenzieren war. Wird in dem Verdünnungsschritt zusätzlich das elektrochemische Potential durch Zugabe eines Protonophors entkoppelt, kann die Aufnahme von Substrat und damit die Einstellung auf ein neues Gleichgewicht nicht mehr erfolgen und der oben beschriebene Effekt wird verstärkt. Eine solche Reversibilität ist eine Eigenschaft von Transportern, die generell beobachtet werden kann. Es ist möglich, dass diese Reversibilität physiologisch für den Efflux von Substraten aus der Vakuole genutzt wird. Dagegen, dass dies der alleinige Mechanismus für den Efflux ist spricht allerdings, dass die Anreicherung von Substraten bei niedrigen externen Konzentrationen am höchsten ist (s. Abb. 3.4), also dann, wenn unter physiologischen Bedingungen Substrat im Cytoplasma benötigt wird. Mit Sicherheit besitzt die Zelle ein reguliertes System für den Efflux von Substraten aus der Vakuole in das Cytoplasma. Die vorliegenden Daten liefern keine direkten Hinweise darauf, dass die cytoplasmatische Argininkonzentration durch ein paralleles Ablaufen von In- (bzw. Gegentausch) und Efflux über ein weiteres System reguliert wird, wie von Roos *et al.* (1997) für *P. cyclopium* beschrieben. Die Arbeitsgruppe um Roos postuliert diesen Mechanismus aufgrund von Daten, die an ganzen permeabilisierten Zellen gewonnen wurden und im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit stehen. Die in dieser Arbeit weiterführenden *in vitro* Experimente lassen aber die Reversibilität des Aufnahmesystems als Erklärung näherliegend erscheinen. Allerdings kann ein solcher von Roos *et al.* (2001) postulierter Mechanismus auch nicht ausgeschlossen werden. Ein regulierter Efflux durch ein weiteres System (*leakage*), für das theoretisch entweder Diffusion, ein Kanal oder ein Carrier in Frage käme (Stein, 1990), würde bedeuten, dass in Abhängigkeit der externen Konzentration das Substrat mit der Affinität des Aufnahmesystems in die Vakuole transportiert und in Abhängigkeit von der internen Konzentration (mit geringerer Affinität eines Translokators oder Kanals) und des Substratgradienten über der vakuolären Membran wieder in das Cytoplasma geschafft würde. Eine Diffusion von Lysin ist aufgrund der niedrigen Diffusionskonstante ausgeschlossen, für *N. crassa* wurde vermutet, dass die vakuoläre Membran auch für hochangereicherte Kationen impermeabel ist (Cramer & Davis, 1984). Um die Elektroneutralität in der Vakuole zu erhalten, ist es wahrscheinlich, dass mit dem Efflux von Lysin ein Kation exportiert oder im Gegenzug ein Anion importiert wird. Eine erleichterte

Diffusion, oder der von Sagne *et al.* (2001) und Russnak *et al.* (2001) postulierte Export im Modus eines H⁺/Aminosäure-Symports könnte dem Efflux zugrunde liegen. Würde *S. cerevisiae* den cytoplasmatischen Aminosäurepool über eine energieabhängige Aufnahme und einen energieunabhängigen Efflux in Form eines *leakage* Mechanismus regulieren, in ähnlicher Weise, wie für *P. cyclopium* von Roos *et al.* (1997) vermutet, hieße das, dass die Vakuole Metabolite in hoher Konzentration speichern und eine Erniedrigung der cytosolischen Substratkonzentration (aufgrund metabolischen Umsatzes) mit einem Efflux aus der Vakuole kompensieren würde. Dieser Mechanismus hätte den Vorteil, dass eine ständige Anpassung der cytoplasmatischen Aminosäurekonzentration an den zellulären Bedarf garantiert wäre. Die hier gezeigten Daten legen nahe, dass der detektierte Efflux auf die Reversibilität des Aufnahmesystems zurückzuführen ist. Es ist aber möglich, dass ein bestehender Effluxmechanismus über ein weiteres System (s.o.), von dieser Reversibilität des Aufnahmesystems überdeckt und daher nicht differenziert wurde.

Roos *et al.*, (1997) beschreiben eine verminderte Effluxgeschwindigkeit bei Erniedrigung der externen ATP-Konzentration und einen Wiederanstieg der Geschwindigkeit bei weiterer Erniedrigung des externen ATP. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Effluxgeschwindigkeit und der externen ATP-Konzentration. Die Aufnahme von Arginin bei 0,2 bzw. 0,075 mM ATP war unverändert (s. Abb. 3.20), was auf ein ausreichendes elektrochemisches Potential über der vakuolären Membran hinweist, während die Geschwindigkeit des Effluxes bei diesen Konzentrationen im Vergleich zu 1 mM ATP im Medium verringert war. (s. Abb. 3.21 & Abb. 3.22). Die physiologische Relevanz einer ATP-Abhängigkeit des Aminosäureeffluxes aus vakuolären Vesikeln ist fraglich. Generell ist es für die Zelle erstrebenswert, die ATP-Konzentration möglichst konstant zu halten. Unter Stickstoffmangel wurde für *S. cerevisiae* ein Abfall des ATP-Levels von 4 mM auf ein 1 mM gemessen (Lopez & Gancedo, 1979). Nach 24 Stunden Stickstofflimitation war in *S. cerevisiae* die ATP-Produktion auf 20 % der Ausgangswerte erniedrigt (Lagunas & Ruiz, 1988). Drainas *et al.* (1982) zeigten in *N. crassa* eine vollständige Hemmung der Argininmobilisierung aus der Vakuole in Anwesenheit von verschiedenen Inhibitoren oder Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung, die in einem erniedrigten ATP-Pool resultierten. Diese in der Literatur beschriebenen Effekte von Stickstoffmangel auf die zelluläre ATP-Konzentration umfassen einen Zeitraum von mehreren Stunden. Die Mobilisierung von Arginin kann aber erheblich schneller (unter einer Stunde) gemessen werden (Messenguy *et al.*, 2000). Auch der Einfluss der oben beschriebenen Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung auf den Argininefflux (Drainas *et al.*, 1982), hat durch die Störung des zentralen Metabolismus zu komplexe Auswirkungen auf die gesamte Zelle, um sie direkt mit der unterbundenen Mobilisierung von Arginin unter Stickstoffstress in Verbindung zu bringen. In diesem Bereich sind weitere Experimente nötig, um zu untersuchen, welche Komponenten den Efflux von Aminosäuren aus

der Vakuole steuern könnten. Die Messung des Arginineffluxes aus vakuolären Vesikeln stickstofflimitierter Zellen könnte weitere Informationen über den Mechanismus liefern. Allerdings stoßen hier verschiedene Faktoren aufeinander, die diesen Ansatz erschweren. Es wurde in vakuolären Vesikeln stickstofflimitierter Zellen im Vergleich zu solchen aus normal gezogenen Zellen eine erniedrigte Akkumulationskapazität für Arginin gemessen. Die Vorbeladung von Vesikeln limitierter Zellen bis zu einer definierten internen Konzentration würde demzufolge eine höhere externe Substratkonzentrationen erfordern als die Vorbeladung von Vesikeln nicht limitierter Zellen. Dadurch würden sich die experimentellen Voraussetzungen verschieben, was eine Interpretation der Daten erschwert.

4.1.3. Vakuoläre Vesikel stickstofflimitierter Zellen

Die Aufnahme von Arginin in vakuoläre Vesikel stickstofflimitierter Zellen wurde gemessen, um mögliche Modifikationen der vakuolären Aufnahmesysteme infolge der Adaption an Stickstoffmangelbedingungen zu untersuchen. Die Zelle leitet unter Stressbedingungen autophagische Prozesse ein (Scott *et al.*, 1996; Takeshige *et al.*, 1992), die zu einem Transport cytoplasmatischer Proteine in die Vakuole führen. Die Vakuole wird währenddessen in ihrer Physiologie verändert: Autophagosomen, die cytoplasmatische Bestandteile umschließen, werden in die Vakuole aufgenommen. Dadurch verändert sich die Größe der Vakuole, die Zusammensetzung ihrer Membran, sowie ihr Inhalt in Abhängigkeit von der Dauer der Limitation. Diese Veränderungen der vakuolären Zusammensetzung haben sich als limitierender Faktor für die Möglichkeit der Isolierung vakuolärer Vesikel aus stickstofflimitierten Zellen herausgestellt. Nach 45 Minuten Stickstoffstress konnte eine Präparation durchgeführt und die Aminopeptidase (DPAP) B als vakuoläres Leitenzym gemessen werden. Die Gesamtaktivität der DPAP B im Lysat und in der Vesikelfraktion nach Stickstofflimitation war fast doppelt so hoch wie im Lysat und den Vesikeln der Zellen, die unter Normalbedingungen kultiviert worden waren. Die Ausbeute vakuolärer Vesikel nach limitierenden und nach nicht limitierenden Bedingungen war gleich. Die spezifische Aktivität in der Vesikelfraktion nach limitierenden Bedingungen war 7fach angereichert, während in der Präparation nicht limitierter Zellen eine 20fache Anreicherung gemessen wurde (s. Tabelle 3.6). Diese Daten lassen sich mit der einsetzenden Autophagie unter limitierenden Bedingungen erklären, in deren Folge die Vakuole relativ zum Lysat einen höheren Anteil an Protein enthält und infolgedessen die spezifische Aktivität erniedrigt wird. Da die Ausbeute beider Präparationen aber identisch war, ist anzunehmen, dass sich die absolute Menge vakuolärer Membranen in den beiden Vesikelpräparationen im gleichen Rahmen bewegt. Insgesamt war die Enzymaktivität der Aminopeptidase B in der vakuolären Fraktion höher, wenn die Zellen auf YPD-Medium

gewachsen, als wenn sie in CBS-Medium kultiviert worden waren. Dies hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass die Zellen in CBS-Medium verschiedene Komponenten wie z. B. Aminosäuren synthetisieren müssen, die in YPD-Medium durch das Vorliegen von Peptiden schneller zugänglich sind und die Zelle dadurch in letzterem einen generell höheren Turnover hat. Das Zeitfenster der Stickstofflimitation kann in weiteren Arbeiten erweitert werden. Die nach 45 Minuten Stickstofflimitation präparierten Vesikel zeigten eine gute Transportkompetenz; erst nach 1,5 Stunden Stickstoffstress war die Organellenisolierung erschwert.

Die vielfach beschriebene Mobilisierung unter Stickstofflimitation (Kitamoto *et al.*, 1988, Messenguy *et al.*, 2000) gab Anlass dazu, die Akkumulation von Arginin in vakuoläre Vesikel zu untersuchen, nachdem die Zelle einer Stickstofflimitation unterworfen war. Eine Vergleich der kinetischen Parameter der Argininaufnahme von Vesikelpräparationen nicht limitierter und limitierter Zellen zeigte bei letzteren eine erniedrigte Maximalgeschwindigkeit, die allerdings von der Güte abhängig und daher zwischen zwei Präparationen nur schwer zu vergleichen ist (s.o.). Es wurde ein um 50 % erniedrigter K_t -Wert für die Vesikel stickstofflimitierter Zellen gemessen. Aus einer Veränderung in diesem Bereich kann nicht auf eine physiologische Signifikanz geschlossen werden. Dies kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass eine Modifikation durch eine feste, kovalente Bindung eines Effektors an das Aufnahmesystem infolge von Stickstoffhunger nicht erfolgt. Eine Regulation durch allosterische Effektoren ist möglich, aufgrund der schwächeren Bindung ist es wahrscheinlich, dass entsprechend modifizierende Komponenten während der Präparation verloren gehen und daher nicht erfasst werden können.

4.2. Proteomanalyse vakuolärer Membranen aus *S. cerevisiae*:

Mit Hilfe der 2-D Elektrophorese können die in einem bestimmten Status der Zelle vorhandenen Proteine gleichzeitig aufgetrennt werden, womit diese Technik die Möglichkeit liefert, die Dynamik des Proteoms, z. B. infolge sich ändernder Wachstumsbedingungen oder unterschiedlicher Zellstadien, zu untersuchen. Durch die Isolierung einzelner Organellen können die Auswirkungen auf speziell diese Kompartimente analysiert werden. Dabei ist eine hohe Membrananreicherung wichtig, um das Vorhandensein von *low copy* Proteinen zu erhöhen (Wilkins *et al.*, 1998; Santoni *et al.*, 2000; Peng & Gygi, 2001). Diese Voraussetzung war mit der Isolierung vakuolärer Vesikel erfüllt. Ziel dieses Ansatzes war es, vakuoläre Proteine, insbesondere Membranproteine, mittels 2-DE aufzutrennen, um mögliche Auswirkungen von stickstofflimitierenden Bedingungen auf das vakuoläre Proteom beobachten zu können. Dafür musste die Auftrennung von integralen Membranproteinen in der 2-DE erreicht werden. Die Proteine mussten im sogenannten Lysispuffer in Lösung gebracht und die

Bedingungen für eine maximale Löslichkeit über die Dauer der gesamten 2-DE Prozedur, hier 32 Stunden, aufrecht erhalten werden. Neben dem initialen Schritt, die Proteine in Lösung zu bringen, besteht insbesondere bei der Übertragung dieser von der ersten in die zweite Dimension die Gefahr des Proteinverlustes: während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) wandern die Proteine unter dem Einfluss eines elektrischen Feldes zu der Position im pH-Gradienten, an dem ihre Nettoladung null ist (isoelektrischer Punkt). Unter dieser Bedingung haben sie ihre geringste Löslichkeit, da zwischen den Molekülen keine elektrostatische Abstoßung mehr besteht. Das Lösungsmittel wird durch das Zusammenpressen der Proteine ausgeschlossen und die Protein-Protein-Wechselwirkungen werden maximiert. Dies erhöht die Wahrscheinlichkeit der Aggregation und damit der Präzipitation (Rabilloud, 2000). Für eine maximale Löslichkeit der Proteine musste die Chaotropizität des für die IEF genutzten Lysispuffers hoch sein, was mit der Verwendung von Harnstoff und Thioharnstoff erreicht wurde. Bei zu hohen Konzentrationen bestand allerdings die Gefahr, dass die Protein-Detergenz Wechselwirkungen erniedrigt würden (Rabilloud, 2000). Das Detergenz, das die Proteine optimal "ummanteln" und damit hydrophiler machen soll, soll insbesondere während der IEF deren Aggregation verhindern. Die Optimierung des Lysispuffers wurde anhand der Qualität der Auftrennung (Fokussierung) und der Quantität der präsenten Spots bemessen. Die in dieser Arbeit gewählten Bedingungen führten zu reproduzierbaren 2-D-Gelen, mit ca. 300 klar fokussierten Spots. Durch die massenspektrometrische Messung mittels MALDI-TOF-MS konnte das charakteristische Peptidmuster analysiert und die Proteine durch nachfolgende Datenbanksuche identifiziert werden. So konnte ein statistischer Überblick über die präsenten Proteine gewonnen werden. 54 Proteine wurden mit Hilfe von MALDI-MS identifiziert. 40 Spots entsprachen unterschiedlichen Proteinen, 14 Spots waren Isoformen, die mehrfach auf dem Gel vorhanden waren. Es zeigte sich, dass mit der optimierten Zusammensetzung des Lysispuffers die Auftrennung von Membranproteinen erreicht werden konnte: 18 % der detektierten Proteine waren integrale Membranproteine. Ein großer Teil der Spots musste den Kontaminationen der Präparation, die für die Transportmessungen nicht von Bedeutung waren, zugeordnet werden. Die entsprechenden Proteine stammten aus der Vakuole und weiteren Kompartimenten, wie dem Cytoplasma, dem Golgi-Apparat und sekretorischen Vesikeln, sowie aus den Mitochondrien. Die Vesikelpräparation beinhaltete eine 30 %ige Ausbeute der Aminopeptidase A, ein Leitenzym des Golgi-Apparates (s. auch Abschnitt 3.1.1). Entsprechend wies die Gesamtheit der präsenten Proteine auf dem Gel einen relativ hohen Anteil solcher auf, die dem Golgi-Apparat und dem vesikulären Transport zugeordnet wurden. Ebenfalls waren lösliche, membranassoziierte und integrale Membranproteine der Mitochondrien vorhanden. Die Protoplasten und Vakuolen wurden durch hypotone Lyse aufgeschlossenen, bei der die Mitochondrien wegen ihrer geringen Größe und Kompaktheit intakt blieben. Die wenigen in der Präparation verbliebenen Mitochondrien wurden erst in der Probenvorbereitung für die 2-D

Elektrophorese aufgeschlossen, so dass ihr Proteinanteil vollständig auf den Gelen vertreten war. Trotz der erreichten Auftrennung integraler Membranproteine mit dem verwendeten Lysispuffer, muss für die Detektion von Proteinen der vakuolären Membran mit höherer Hydrophobizität, wie sekundäre Transporter, das Detektionslimit erniedrigt werden: da auf dem Gel auch höher abundante Membranproteine, wie Anteile der V-ATPase in relativ kleinen Spots vertreten sind, werden geringer abundante, stärker hydrophobe Proteine mit der üblicherweise verwendeten *Coomassie*-Anfärbung auf dem Gel kaum zu erkennen sein. Verschiedene Ansätze können zur Beseitigung dieser Probleme dienen: durch Waschen der Präparation mit Puffern hoher Ionenstärke und gegebenenfalls höherem pH kann eine Abreicherung unerwünschter Proteine erreicht werden. Dadurch sind die entsprechenden Spots nicht mehr auf dem Gel präsent und die Kapazität des Lysispuffers für hydrophobe Proteine wird erhöht. Durch die Anfärbung der Gele mit Silbernitrat kann eine fast 100fach höhere Sensitivität für die Detektion erreicht werden; silbergefärbte Proteine können mittlerweile per MALDI-MS analysiert werden (Shevchenko *et al.*, 1996). Das Detektionslimit bei Silberfärbungen liegt bei 1-10 ng (Rabilloud *et al.*, 1992), eine Detektion von Proteinen mit MALDI-MS ist bis in den oberen Femtomolbereich möglich (Vorm *et al.*, 1994). Eine Mikrosequenzierung dieser geringen Proteinmengen aus silbergefärbten Gelen kann per Nano-Elektrospray-MS/MS durchgeführt werden (Wilm *et al.*, 1994; Wilm *et al.*, 1996), wenn die Identifizierung nach der Datenbankanalyse durch den *peptide-fingerprint* nicht eindeutig ist. Hinsichtlich der Detektion und Identifikation von gering abundanten Proteinen auf 2-D-Gelen bestehen also weiterhin vielversprechende Möglichkeiten.

2-D Gele vakuolärer Vesikel stickstofflimitierter Zellen wurden hergestellt und mit solchen nicht limitierter Zellen verglichen, wobei berücksichtigt wurde, dass eine geringere Abundanz von Proteinen auf dem CBS-N Gel auch auf den höheren Gehalt an Gesamtprotein der Präparation zurückzuführen sein könnte. Es sollten Hinweise auf die Regulation von Komponenten des Stickstoffmetabolismus auf transkriptioneller Ebene, sowie durch den Abbau von Proteinen, gewonnen werden. Regulation des Stickstoffmetabolismus auf transkriptioneller und auf Proteinebene wurde beobachtet (Wiame *et al.*, 1985; Miller & Magasanik, 1991; Magasanik, 1992). Der Vergleich angefertigter 2-D Gele von Vesikelpräparationen 45 Minuten stickstofflimitierter und nicht limitierter Zellen wies Unterschiede auf, die spezifisch auf eine Anpassung der Vakuole an Stickstoffmangelbedingungen zurückgeführt werden konnten. Vtc4p (*vacuolar transport chaperon*), ist ein cytoplasmatisch lokalisiertes, integrales Membranprotein, das in den Transport von Phosphat die Vakuole involviert ist. Dieses Protein war auf dem Gel nach 45 Minuten Stickstofflimitation nicht mehr zu detektieren. Das Vorhandensein großer Mengen Polyphosphat (Indge, 1968; Urech *et al.*, 1978) und der enge Zusammenhang des quantitativen Vorkommens von Arginin und Polyphosphat in der Vakuole (Dürr *et al.*, 1979) führte zu der Annahme, dass die Retention basischer Aminosäuren in der Vakuole unter

anderem durch eine Bindung an Polyphosphat zustande kommen könnte (Horak, 1986). Obwohl gezeigt wurde, dass die Speicherung und Mobilisierung von Arginin unabhängig voneinander möglich sind (Dürr *et al.*, 1979), könnte der Abbau von Vtc4p einen Zusammenhang zwischen der Argininmobilisierung unter Stickstoffstress und der daraus resultierenden Erniedrigung vakuolär benötigten Phosphats als Gegenion widerspiegeln. Für Cps1p, die vakuolär lokalisierte Carboxypeptidase S, wurde eine Reprimierung der Transkription bei schlechter Stickstoffquelle beschrieben (Bordallo & Suarez-Renduelez, 1993). Der erhöhte Level der Carboxypeptidase S auf dem CBS-N-Gel ist konsistent mit dem Anstieg der proteolytischen Aktivität infolge der unter Stickstofflimitation einsetzenden Autophagie. Für Lap4p, die vakuolär lokalisierte Aminopeptidase I ist bisher keine erhöhte Expression nach Stressbedingungen beschrieben worden. Da im Rahmen der Autophagie viele hydrolytische Enzyme hochreguliert werden, ist eine verstärkte Expression dieses Enzyms im Rahmen der Stickstofflimitation gut möglich. Das 2-D Gel vakuolärer Vesikel nach Stickstofflimitation zeigte auch bezüglich nichtvakuolärer Proteine ein verändertes Muster. Put2p, die in den Mitochondrien lokalisierte δ -1-Pyrrolin-5-Carboxylat-Dehydrogenase (Brandriss & Krzywicki, 1986), wurde nur auf dem CBS-N-Gel detektiert. Bei Wachstum der Zellen auf Ammonium, der bevorzugten Stickstoffquelle, werden Enzyme, die für die Verstoffwechslung schlechter Stickstoffquellen wie Harnstoff und Prolin notwendig sind, reprimiert (*nitrogen catabolite repression, NCR*), während deren Expression unter Stickstoffmangel induziert wird. Die Synthese von Put2p wird infolge einer ansteigenden Prolin-Konzentration induziert, die wiederum durch die Mobilisierung von Arginin aus der Vakuole infolge des Stickstoffstresses und dessen cytosolischer Umsetzung zu Prolin zustande kommt (Magasanik & Brandriss, 1980; Brandriss, 1983). Prolin wird in die Mitochondrien transportiert, wo es über die Bindung an einen Transkriptionsfaktor, Put3p die Expression von Put2p aktiviert. Das Enzym katalysiert die Umsetzung des aus Prolin stammenden Glutamat-5-Semialdehyd in Glutamat. Durch diesen Stoffwechselweg wird der Zelle ausreichend Glutamat als zentralen Metaboliten des Stickstoffstoffmetabolismus bereitgestellt. Die Detektion des Proteins nur in vakuolären Vesikeln stickstofflimitierter Zellen steht folglich in klarem Zusammenhang mit der stressinduzierten Mobilisierung von Arginin aus der Vakuole. Für Sam1p, die S-Adenosylmethionin Synthetase 1, ist bisher keine Lokalisierung bekannt. Beschrieben wurde eine Reprimierung der Expression nach 15 minütiger Inhibierung der Proteinbiosynthese durch Hemmstoffe (Jia *et al.*, 2000), sowie eine Herabregulation bei hypoosmotischem Stress (Norbeck & Blomberg, 1997). Diese regulatorischen Antworten sind in Einklang damit, dass das Protein in dem CBS-N Gel erheblich geringer abundant war im Vergleich zu dem Gel vakuolärer Vesikel nicht limitierter Zellen. Der Zeitrahmen des Stickstoffstresses von 45 Minuten stimmte gut mit der Mobilisierung von Arginin nach spätestens 30 Minuten (R. Hecker, unveröffentlichte Daten) überein. Eine Erweiterung des Zeitfensters der Stickstofflimitation (s. 4.3) würde die Abundanz neu synthetisierter Proteine

infolge des Stresses erhöhen. Ferner kann neben der Stickstofflimitation, die eine Umsetzung der Zellen auf eine schlechter nutzbare Stickstoffquelle beinhaltet, auch ein Stickstoffhunger getestet werden, bei dem die Zellen während des Stresses auf stickstofffreiem Medium inkubiert werden. Berücksichtigt werden muss allerdings, dass mit einer Verschärfung der Stressbedingungen die Qualität der Präparation durch die entsprechend länger andauernde Autophagie verändert wird.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Für die Regulation der cytoplasmatischen Konzentration verschiedener Metabolite ist der kontrollierte bidirektionale Fluss von Substanzen über die vakuoläre Membran von *S. cerevisiae* eine Notwendigkeit. Ziel der Arbeit war es, anhand eines *in vitro* Meßsystems vakuolärer Vesikel Daten über den Im- und Export von Substanzen generell und nach verschiedenen Wachstumsbedingungen der Zellen zu gewinnen. Ausserdem sollte das Proteom der vakuolären Membran untersucht und globale Veränderungen im Proteinmuster im Rahmen des Adaptionsprozesses an limitierende Wachstumsbedingungen untersucht werden.

Als Basis der Arbeiten konnte eine Präparation vakuolärer Vesikel erarbeitet werden, die, nach Charakterisierung über Leitenzymaktivitäten, eine hohe Anreicherung vakuolärer Membranen beinhaltete. Mitochondrien und Bestandteile der Plasmamembran waren nur geringfügig in der Präparation vorhanden.

Für Glutamat, Aspartat, Prolin, Valin, Threonin und Alanin wurde Veröffentlichungen zufolge keine aktive Aufnahme in vakuoläre Vesikel gemessen (Ohsumi *et al.*, 1981). Anhand von Aufnahmemessungen konnte in dieser Arbeit aber gezeigt werden, dass die Vesikel energieabhängig Threonin importieren. Russnak *et al.*, (2001) beobachtete eine Aufnahme von Glutamat in Abwesenheit von ATP. Für diese Aminosäure wurde hier weder eine energieabhängige, noch eine energieunabhängige Aufnahme gemessen und damit die Daten von Ohsumi *et al.*, 1981 bestätigt. Zwei ORFs, deren Genprodukte für vakuolären Polyamintransport in Frage kamen, wurden anhand vakuolärer Vesikel näher untersucht. Für Ycr023cp wurde aufgrund von Sequenzhomologien ein Polyamintransporter vermutet. Nach vergleichenden Aufnahmemessungen zwischen einer Deletionsmutante und dem Wildtyp bestanden aber keine Unterschiede in der Polyaminaufnahme in vakuoläre Vesikel. Ebenso ergaben Vergleichsmessungen mit einer Deletionsmutante des ORFs *YLL028w* und dem Wildtyp keine Unterschiede in der Polyaminaufnahme, daher ist für beide Genprodukte eine Funktion als vakuolärer Polyamintransporter unwahrscheinlich. Es besteht aber die Möglichkeit, dass weitere Polyamintransporter in der vakuolären Membran die Deletion kompensieren.

Anhand von Effluxmessungen mit dem *in vitro* System vakuoläre Vesikel wurden Daten gewonnen, die die Reversibilität vakuolärer Aufnahmesysteme für Aminosäuren verdeutlichen. Es wurde gezeigt, dass der aktuelle vakuoläre Substratpool mit der Akkumulationskapazität der Vakuole und dem Substratgradienten über der vakuolären Membran in Zusammenhang steht. Möglich ist, dass die Reversibilität der Aufnahmesysteme physiologisch genutzt wird. Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Substratkonzentration in der Vakuole unter anderem aus einer aktiven Aufnahme und einem energieunabhängigen Efflux in Form erleichterter Diffusion resultiert, wie für *P. cyclopium* beschrieben und so Schwankungen in der cytoplasmatischen

Konzentration schnell ausgeglichen werden können. Aus den charakteristischen Affinitäten und spezifischen Aktivitäten des Aufnahme- und eines möglichen Effluxsystems würde die intravakuoläre Substratkonzentration hervorgehen. Den Ergebnissen zufolge ist es unwahrscheinlich, eine kovalente Modifikation des Aufnahmesystems an dem erhöhten Efflux von Arginin unter Stickstofflimitation involviert ist.

Nach Optimierung verschiedener Komponenten für die Trennung der vesikulären Präparation mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese konnten reproduzierbare Gele mit etwa 300 klar fokussierten Spots angefertigt werden. Ein Anteil der präsenten Proteine wurde mittels MALDI-TOF-MS analysiert und durch nachfolgende Datenbankrecherche identifiziert. Über 20% der Spots wurden der Vakuole zugeordnet, 18% waren integrale Membranproteine. Der Vergleich zweidimensional aufgetrennter vakuolärer Proteine limitierter und nicht limitierter Zellen zeigte Unterschiede, die sich auf die stickstofflimitierenden Wachstumsbedingungen der Zellen zurückführen ließen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- 1) T. Achstetter and D. H. Wolf. Proteinases, proteolysis and biological control in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 1 (2):139-157, 1985.
- 2) P. G. Bertram, J. H. Choi, J. Carvalho, T.- F. Chan, W. Ai and X. F. S. Zheng. Convergence of TOR-Nitrogen and Snf1-Glucose Signaling Pathways onto Gln3. *Molecular and Cellular Biology*, Feb. 2002: 1246-1252, 2002
- 3) D. Blinder and B. Magasanik. Recognition of nitrogen-responsive upstream activation sequences of *Saccharomyces cerevisiae* by the product of the GLN3 gene. *J.Bacteriol.* 177 (14):4190-4193, 1995.
- 4) D. Blinder, P. W. Coschigano, and B. Magasanik. Interaction of the GATA factor Gln3p with the nitrogen regulator Ure2p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 178 (15):4734-4736, 1996.
- 5) J. Bolard. Interaction of polyene antibiotics with membrane lipids: physicochemical studies of the molecular basis of selectivity. *Drugs Exp.Clin.Res.* 12 (6-7):613-618, 1986 (a).
- 6) J. Bolard. How do the polyene macrolide antibiotics affect the cellular membrane properties? *Biochim.Biophys.Acta* 864 (3-4):257-304, 1986 (b).
- 7) J. W. Booth and G. Guidotti. Phosphate transport in yeast vacuoles. *J.Biol.Chem.* 272 (33):20408-20413, 1997.
- 8) J. Bordallo and P. Suarez-Rendueles. Control of *Saccharomyces cerevisiae* carboxypeptidase S (CPS1) gene expression under nutrient limitation. *Yeast* 9 (4):339-349, 1993.
- 9) B. J. Bowman and E. J. Bowman. H⁺-ATPases from mitochondria, plasma membranes, and vacuoles of fungal cells. *J.Membr.Biol.* 94 (2):83-97, 1986.
- 10) M. C. Brandriss and B. Magasanik. Proline: an essential intermediate in arginine degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 143 (3):1403-1410, 1980.
- 11) M. C. Brandriss. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT2 gene. *Mol.Cell Biol.* 3 (10):1846-1856, 1983.

- 12) M. C. Brandriss and K. A. Krzywicki. Amino-terminal fragments of delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase direct beta-galactosidase to the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 6 (10):3502-3512, 1986.
- 13) N. J. Bryant and T. H. Stevens. Vacuole biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* 62 (1):230-247, 1998.
- 14) N. Bysani, J. R. Daugherty, and T. G. Cooper. Saturation mutagenesis of the UASNTR (GATAA) responsible for nitrogen catabolite repression-sensitive transcriptional activation of the allantoin pathway genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 173 (16):4977-4982, 1991.
- 15) J. A. Coffman, H. M. el Berry, and T. G. Cooper. The URE2 protein regulates nitrogen catabolic gene expression through the GATAA-containing UASNTR element in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 176 (24):7476-7483, 1994.
- 16) T. G. Cooper. The regulation of yeast gene expression by multiple control elements. *Basic Life Sci.* 19:143-161, 1982.
- 17) T. G. Cooper, R. Rai, and H. S. Yoo. Requirement of upstream activation sequences for nitrogen catabolite repression of the allantoin system genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 9 (12):5440-5444, 1989.
- 18) P. W. Coschigano and B. Magasanik. The URE2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae* plays an important role in the cellular response to the nitrogen source and has homology to glutathione s-transferases. *Mol.Cell Biol.* 11 (2):822-832, 1991.
- 19) W. E. Courchesne and B. Magasanik. Regulation of nitrogen assimilation in *Saccharomyces cerevisiae*: roles of the URE2 and GLN3 genes. *J.Bacteriol.* 170 (2):708-713, 1988.
- 20) M. Crabeel and M. Grenson. Regulation of histidine uptake by specific feedback inhibition of two histidine permeases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* 14 (1):197-204, 1970.
- 21) C. L. Cramer and R. H. Davis. Polyphosphate-cation interaction in the amino acid-containing vacuole of *Neurospora crassa*. *J.Biol.Chem.* 259 (8):5152-5157, 1984.

- 22) K. W. Cunningham and G. R. Fink. Ca²⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Exp.Biol.* 196:157-166, 1994.
- 23) T. S. Cunningham and T. G. Cooper. Expression of the DAL80 gene, whose product is homologous to the GATA factors and is a negative regulator of multiple nitrogen catabolic genes in *Saccharomyces cerevisiae*, is sensitive to nitrogen catabolite repression. *Mol.Cell Biol.* 11 (12):6205-6215, 1991.
- 24) V. M. Darley Usmar, D. Rickwood, M.T. Wilson. *Mitochondria: A Practical Approach*. IRL Press Limited, Oxford, England, 1987.
- 25) C. Dass. *Principles and Practice of Biological Mass Spectrometry*. Wiley-Interscience, 2001
- 26) G. Daum, N. D. Lees, M. Bard, and R. Dickson. Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14 (16):1471-1510, 1998.
- 27) J.R. Dickinson, M. Schweizer (Eds.). *The metabolism and molecular physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Taylor & Francis, London, 1999
- 28) C. Drainas and R. L. Weiss. Energetics of vacuolar compartmentation of arginine in *Neurospora crassa*. *J.Bacteriol.* 150 (2):770-778, 1982.
- 29) C. Drainas and R. L. Weiss. Energy requirement for the mobilization of vacuolar arginine in *Neurospora crassa*. *J.Bacteriol.* 150 (2):779-784, 1982.
- 30) M. Dürr, T. Boller, and A. Wiemken. Polybase induced lysis of yeast spheroplasts. A new gentle method for preparation of vacuoles. *Arch.Microbiol.* 105 (3):319-327, 1975.
- 31) M. Dürr, K. Urech, T. Boller, A. Wiemken, J. Schwencke, M. Nagy. Sequestration of arginine by polyphosphate in vacuoles of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Microbiol.* 121: 169-175, 1979.
- 32) Goffeau, B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, and S. G. Oliver. Life with 6000 genes. *Science* 274 (5287):546, 563-546, 567, 1996.
- 33) Goffeau, J. Park, I. T. Paulsen, J. L. Jonniaux, T. Dinh, P. Mordant, and M. H. Saier, Jr. Multidrug-resistant transport proteins in yeast: complete inventory and phylogenetic

- characterization of yeast open reading frames with the major facilitator superfamily. *Yeast* 13 (1):43-54, 1997.
- 34) N. J. Greenfield, M. Hussain, and J. Lenard. Effects of growth state and amines on cytoplasmic and vacuolar pH, phosphate and polyphosphate levels in *Saccharomyces cerevisiae*: a ³¹P- nuclear magnetic resonance study. *Biochim.Biophys.Acta* 926 (3):205-214, 1987.
- 35) R. J. Hansen, R. L. Switzer, H. Hinze, and H. Holzer. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. *Biochim.Biophys.Acta* 496 (1):103-114, 1977.
- 36) G. Hinnebusch. Mechanisms of gene regulation in the general control of amino acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Rev.* 52 (2):248-273, 1988.
- 37) R. Holmes, A. Collings, K. J. Farnden, and M. G. Shepherd. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: evidence for activity of glutamate synthase. *J.Gen.Microbiol.* 135 (Pt 6):1423-1430, 1989.
- 38) R. Holmes, G. S. McNaughton, R. D. More, and M. G. Shepherd. Ammonium assimilation by *Candida albicans* and other yeasts: a ¹³N isotope study. *Can.J.Microbiol.* 37 (3):226-232, 1991.
- 39) J. Horak. Amino acid transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim.Biophys.Acta* 864 (3-4):223-256, 1986.
- 40) C. S. Huang, S. J. Kopacz, and C. P. Lee. Mechanistic differences in the energy-linked fluorescence decreases of 9-aminoacridine dyes associated with bovine heart submitochondrial membranes. *Biochim.Biophys.Acta* 722 (1):107-115, 1983.
- 41) K. Igarashi and K. Kashiwagi. Polyamine transport in bacteria and yeast. *Biochem.J.* 344 Pt 3:633-642, 1999.
- 42) K. J. Indge. The isolation and properties of the yeast cell vacuole. *J.Gen.Microbiol.* 51 (3):441-446, 1968.
- 43) J. C. Jauniaux, L. A. Urrestarazu, and J. M. Wiame. Arginine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: subcellular localization of the enzymes. *J.Bacteriol.* 133 (3):1096-1107, 1978.

- 44) J. C. Jauniaux, M. Vandenbol, S. Vissers, K. Broman, and M. Grenson. Nitrogen catabolite regulation of proline permease in *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of the PUT4 gene and study of PUT4 RNA levels in wild-type and mutant strains. *Eur.J.Biochem.* 164 (3):601-606, 1987.
- 45) J. C. Jauniaux and M. Grenson. GAP1, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other bakers yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolite repression. *Eur.J.Biochem.* 190 (1):39-44, 1990.
- 46) M. H. Jia, R. A. Larossa, J. M. Lee, A. Rafalski, E. Derosé, G. Gonye, and Z. Xue. Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. *Physiol Genomics* 3 (2):83-92, 2000.
- 47) E. W. Jones. The synthesis and function of proteases in *Saccharomyces*: genetic approaches. *Annu.Rev.Genet.* 18:233-270, 1984.
- 48) M. U. Jorgensen, M. B. Bruun, T. Didion, and M. C. Kielland-Brandt. Mutations in five loci affecting GAP1-independent uptake of neutral amino acids in yeast. *Yeast* 14 (2):103-114, 1998.
- 49) Y. Kakinuma, Y. Ohsumi, and Y. Anraku. Properties of H⁺-translocating adenosine triphosphatase in vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 256 (21):10859-10863, 1981.
- 50) K. Kashiwagi, S. Miyamoto, F. Suzuki, H. Kobayashi, and K. Igarashi. Excretion of putrescine by the putrescine-ornithine antiporter encoded by the potE gene of *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89 (10):4529-4533, 1992.
- 51) K. Kitamoto, K. Yoshizawa, Y. Ohsumi, and Y. Anraku. Dynamic aspects of vacuolar and cytosolic amino acid pools of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 170 (6):2683-2686, 1988.
- 52) H. Klasson, G. R. Fink, and P. O. Ljungdahl. Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol.Cell Biol.* 19 (8):5405-5416, 1999.
- 53) D. J. Klionsky, P. K. Herman, and S. D. Emr. The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol.Rev.* 54 (3):266-292, 1990.

- 54) D. J. Klionsky and S. D. Emr. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290 (5497):1717-1721, 2000.
- 55) R. Lagunas and E. Ruiz. Balance of production and consumption of ATP in ammonium-starved *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Gen.Microbiol.* 134 (Pt 9):2507-2511, 1988.
- 56) T. L. Legerton and R. L. Weiss. Mobilization of sequestered metabolites into degradative reactions by nutritional stress in *Neurospora*. *J.Bacteriol.* 138 (3):909-914, 1979.
- 57) T. L. Legerton and R. L. Weiss. Mobilization of vacuolar arginine in *Neurospora crassa*. Mechanism and role of glutamine. *J.Biol.Chem.* 259 (14):8875-8879, 1984.
- 58) Z. S. Li, M. Szczypka, Y. P. Lu, D. J. Thiele, and P. A. Rea. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S- conjugate pump. *J.Biol.Chem.* 271 (11):6509-6517, 1996.
- 59) L. P. Lichko and L. A. Okorokov. Some properties of membrane-bound, solubilized and reconstituted into liposomes H⁺-ATPase of vacuoles of *Saccharomyces carlsbergensis*. *FEBS Lett.* 174 (2):233-237, 1984.
- 60) S. Lopez and J. M. Gancedo. Effect of metabolic conditions on protein turnover in yeast. *Biochem.J.* 178 (3):769-776, 1979.
- 61) M. C. Lorenz and J. Heitman. Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strains. *Genetics* 150 (4):1443-1457, 1998.
- 62)** B. Magasanik. Regulation of nitrogen utilization. In: The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*: Gene expression (Jones E.W., Pringle J.R., Broach J.R., Eds.), pp. 283-317. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1992.
- 63) M. Marini, S. Soussi-Boudekou, S. Vissers, and B. Andre. A family of ammonium transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 17 (8):4282-4293, 1997.
- 64) F. Messenguy, D. Colin, and J. P. ten Have. Regulation of compartmentation of amino acid pools in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on metabolic control. *Eur.J.Biochem.* 108 (2):439-447, 1980.

- 65) F. Messenguy, F. Vierendeels, B. Scherens, and E. Dubois. In *Saccharomyces cerevisiae*, expression of arginine catabolic genes CAR1 and CAR2 in response to exogenous nitrogen availability is mediated by the Ume6 (CargRI)-Sin3 (CargRII)-Rpd3 (CargRIII) complex. *J.Bacteriol.* 182 (11):3158-3164, 2000.
- 66) S. M. Miller and B. Magasanik. Role of the complex upstream region of the GDH2 gene in nitrogen regulation of the NAD-linked glutamate dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 11 (12):6229-6247, 1991.
- 67) P. L. Minehart and B. Magasanik. Sequence and expression of GLN3, a positive nitrogen regulatory gene of *Saccharomyces cerevisiae* encoding a protein with a putative zinc finger DNA-binding domain. *Mol.Cell Biol.* 11 (12):6216-6228, 1991.
- 68) C. M. Moehle, M. W. Aynardi, M. R. Kolodny, F. J. Park, and E. W. Jones. Protease B of *Saccharomyces cerevisiae*: isolation and regulation of the PRB1 structural gene. *Genetics* 115 (2):255-263, 1987.
- 69) C. M. Moehle, C. K. Dixon, and E. W. Jones. Processing pathway for protease B of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* 108 (2):309-325, 1989.
- 70) V. Neuhoff, N. Arold, D. Taube, W. Erhardt. *Electrophoresis* 9,255-262,1988.
- 71) M. Nagy. Studies on purine transport and on purine content in vacuoles isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim.Biophys.Acta* 558 (2):221-232, 1979.
- 72) B. Nelissen, R. De Wachter, and A. Goffeau. Classification of all putative permeases and other membrane plurispanners of the major facilitator superfamily encoded by the complete genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Rev.* 21 (2):113-134, 1997.
- 73) J. Norbeck and A. Blomberg. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J.Biol.Chem.* 272 (9):5544-5554, 1997.
- 74) Y. Ohsumi and Y. Anraku. Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 256 (5):2079-2082, 1981.

- 75) Y. Ohsumi and Y. Anraku. Calcium transport driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 258 (9):5614-5617, 1983.
- 76) Y. Ohsumi, K. Kitamoto, and Y. Anraku. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *J.Bacteriol.* 170 (6):2676-2682, 1988.
- 77) J. Peng and S. P. Gygi. Proteomics: the move to mixtures. *J.Mass Spectrom.* 36 (10):1083-1091, 2001.
- 78) T. Rabilloud. A comparison between low background silver diamine and silver nitrate protein stains. *Electrophoresis* 13 (7):429-439, 1992.
- 79) T. Rabilloud. Proteome Research: Two Dimensional Gel Electrophoresis and Identification Methods. Springer Verlag, 2000.
- 80) R. Rai, F. S. Genbauffe, R. A. Sumrada, and T. G. Cooper. Identification of sequences responsible for transcriptional activation of the allantoin permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* 9 (2):602-608, 1989.
- 81) C. K. Raymond, P. J. O'Hara, G. Eichinger, J. H. Rothman, and T. H. Stevens. Molecular analysis of the yeast VPS3 gene and the role of its product in vacuolar protein sorting and vacuolar segregation during the cell cycle. *J.Cell Biol.* 111 (3):877-892, 1990.
- 82) C. J. Roberts, C. K. Raymond, C. T. Yamashiro, and T. H. Stevens. Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol.* 194:644-661, 1991.
- 83) R. J. Roon, H. L. Even, and F. Larimore. Glutamate synthase: properties of the reduced nicotinamide adenine dinucleotide-dependent enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 118 (1):89-95, 1974.
- 84) W. Roos, R. Schulze, and J. Steighardt. Dynamic compartmentation of vacuolar amino acids in *Penicillium cyclopium*. Cytosolic adenylates act as a control signal for efflux into the cytosol. *J.Biol.Chem.* 272 (25):15849-15855, 1997.
- 85) R. Russnak, D. Konczal, and S. L. McIntire. A family of yeast proteins mediating bidirectional vacuolar amino acid transport. *J.Biol.Chem.* 276 (26):23849-23857, 2001.
- 86) C. Sagne, C. Agulhon, P. Ravassard, M. Darmon, M. Hamon, S. El Mestikawy, B. Gasnier, and B. Giros. Identification and characterization of a lysosomal transporter for small neutral amino acids. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 98 (13):7206-7211, 2001.

-
- 87) T. Saheki and H. Holzer. Proteolytic activities in yeast. *Biochim.Biophys.Acta* 384 (1):203-214, 1975.
- 88) V. Santoni, M. Molloy, and T. Rabilloud. Membrane proteins and proteomics: un amour impossible? *Electrophoresis* 21 (6):1054-1070, 2000.
- 89) T. Sato, Y. Ohsumi, and Y. Anraku. Substrate specificities of active transport systems for amino acids in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence of seven independent proton/amino acid antiport systems. *J.Biol.Chem.* 259 (18):11505-11508, 1984.
- 90) T. Sato, Y. Ohsumi, and Y. Anraku. An arginine/histidine exchange transport system in vacuolar-membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 259 (18):11509-11511, 1984.
- 91) D. Schiller, D. Kruse, H. Kneifel, R. Kramer, and A. Burkovski. Polyamine transport and role of potE in response to osmotic stress in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol.* 182 (21):6247-6249, 2000.
- 92) F. Schlenk, C. R. Zydek, D. J. Ehninger, and J. L. Dainko. The production of S-adenosyl-L-methionine and S-adenosyl-L-ethionine by yeast. *Enzymologia.* 29 (3):283-298, 1965.
- 93) J. Schwencke and H. Robichon-Szulmajster. The transport of S-adenosyl-L-methionine in isolated yeast vacuoles and spheroplasts. *Eur.J.Biochem.* 65 (1):49-60, 1976.
- 94) S. V. Scott, A. Hefner-Gravink, K. A. Morano, T. Noda, Y. Ohsumi, and D. J. Klionsky. Cytoplasm-to-vacuole targeting and autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 93 (22):12304-12308, 1996.
- 95) R. Serrano. H⁺-ATPase from plasma membranes of *Saccharomyces cerevisiae* and *Avena sativa* roots: purification and reconstitution. *Methods Enzymol.* 157:533-544, 1988.
- 96) Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal.Chem.* 68 (5):850-858, 1996.
- 97) M. Stanbrough and B. Magasanik. Transcriptional and posttranslational regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 177 (1):94-102, 1995.

-
- 98) W. D. Stein. Channels, Carriers and Pumps. An Introduction to membrane Transport. Academic Press, 1990
- 99) H. Sychrova and M. R. Chevallier. Cloning and sequencing of the *Saccharomyces cerevisiae* gene LYP1 coding for a lysine-specific permease. *Yeast* 9 (7):771-782, 1993.
- 100) C. W. Tabor, H. Tabor, A. K. Tyagi, and M. S. Cohn. The biochemistry, genetics, and regulation of polyamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Fed.Proc.* 41 (14):3084-3088, 1982.
- 101) K. Takeshige, M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda, and Y. Ohsumi. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J.Cell Biol.* 119 (2):301-311, 1992.
- 102) J. Tanaka and G. R. Fink. The histidine permease gene (HIP1) of *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 38 (1-3):205-214, 1985.
- 103) U. Teichert, B. Mechler, H. Muller, and D. H. Wolf. Lysosomal (vacuolar) proteinases of yeast are essential catalysts for protein degradation, differentiation, and cell survival. *J.Biol.Chem.* 264 (27):16037-16045, 1989.
- 104) E. G. ter Schure, H. H. Sillje, A. J. Verkleij, J. Boonstra, and C. T. Verrips. The concentration of ammonia regulates nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 177 (22):6672-6675, 1995.
- 105) E. G. ter Schure, H. H. Sillje, E. E. Vermeulen, J. W. Kalhorn, A. J. Verkleij, J. Boonstra, and C. T. Verrips. Repression of nitrogen catabolic genes by ammonia and glutamine in nitrogen-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* 144 (Pt 5):1451-1462, 1998.
- 106) E. G. ter Schure, N. A. van Riel, and C. T. Verrips. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Rev.* 24 (1):67-83, 2000.
- 107) H. Tomitori, K. Kashiwagi, K. Sakata, Y. Kakinuma, and K. Igarashi. Identification of a gene for a polyamine transport protein in yeast. *J.Biol.Chem.* 274 (6):3265-3267, 1999.

- 108) H. Tomitori, K. Kashiwagi, T. Asakawa, Y. Kakinuma, A. J. Michael, and K. Igarashi. Multiple polyamine transport systems on the vacuolar membrane in yeast. *Biochem.J.* 353 (Pt 3):681-688, 2001.
- 109) K. Urech, M. Durr, T. Boller, A. Wiemken, and J. Schwencke. Localization of polyphosphate in vacuoles of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* 116 (3):275-278, 1978.
- 110) N. A. van Riel, M. L. Giuseppin, E. G. TerSchure, and C. T. Verrips. A structured, minimal parameter model of the central nitrogen metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the prediction of the behavior of mutants. *J.Theor.Biol.* 191 (4):397-414, 1998.
- 111) M. Vandebol, J. C. Jauniaux, and M. Grenson. Nucleotide sequence of the *Saccharomyces cerevisiae* PUT4 proline- permease-encoding gene: similarities between CAN1, HIP1 and PUT4 permeases. *Gene* 83 (1):153-159, 1989.
- 112) C. Verduyn, E. Postma, W. A. Scheffers, and J. P. Van Dijken. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous- culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast* 8 (7):501-517, 1992.
- 113) O. Vorm and P. Roepstorff. Peptide sequence information derived by partial acid hydrolysis and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Biol.Mass Spectrom.* 23 (12):734-740, 1994.
- 114) Y. Wada, Y. Ohsumi, M. Tanifuji, M. Kasai, and Y. Anraku. Vacuolar ion channel of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* 262 (36):17260-17263, 1987.
- 115) Y. Wada, Y. Ohsumi, and Y. Anraku. Chloride transport of yeast vacuolar membrane vesicles: a study of in vitro vacuolar acidification. *Biochim.Biophys.Acta* 1101 (3):296-302, 1992.
- 116) L. S. Weisman, R. Bacallao, and W. Wickner. Multiple methods of visualizing the yeast vacuole permit evaluation of its morphology and inheritance during the cell cycle. *J.Cell Biol.* 105 (4):1539-1547, 1987.
- 117) J. M. Wiame, M. Grenson, and H. N. Arst, Jr. Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi. *Adv.Microb.Physiol* 26:1-88, 1985.

- 118) A. Wiemken and M. Durr. Characterization of amino acid pools in the vacuolar compartment of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* 101 (1):45-57, 1974.
- 119) A. Wiemken. Isolation of vacuoles from yeasts. *Methods Cell Biol.* 12:99-109, 1975.
- 120) A. Wiemken, M. Schellenberg and K. Urech. Vacuoles: the sole compartment of digestive enzymes in yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch.Microbiol.* 123: 23-35, 1979.
- 121) M. R. Wilkins, E. Gasteiger, J. C. Sanchez, A. Bairoch, and D. F. Hochstrasser. Two-dimensional gel electrophoresis for proteome projects: the effects of protein hydrophobicity and copy number. *Electrophoresis* 19 (8-9):1501-1505, 1998.
- 122) M.S. Wilm, M. Mann. *Int.J.Mass Spectrom. Ion Processes* ,136,167-180, 1994.
- 123) M. Wilm, A. Shevchenko, T. Houthaeve, S. Breit, L. Schweigerer, T. Fotsis, and M. Mann. Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379 (6564):466-469, 1996.
- 124) D. P. Woolridge, N. Vazquez-Laslop, P. N. Markham, M. S. Chevalier, E. W. Gerner, and A. A. Neyfakh. Efflux of the natural polyamine spermidine facilitated by the *Bacillus subtilis* multidrug transporter Blt. *J.Biol.Chem.* 272 (14):8864-8866, 1997.
- 125) G. B. Young, D. L. Jack, D. W. Smith, and M. H. Saier, Jr. The amino acid/auxin:proton symport permease family. *Biochim.Biophys.Acta* 1415 (2):306-322, 1999.
- 126) D. A. Yphantis, J. L. Dainko, and F. Schlenk. Effect of some proteins on the yeast cell membrane. *J.Bacteriol.* 94 (5):1509-1515, 1967.
- 127) E. Zinser, C. D. Sperka-Gottlieb, E. V. Fasch, S. D. Kohlwein, F. Paltauf, and G. Daum. Phospholipid synthesis and lipid composition of subcellular membranes in the unicellular eukaryote *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* 173 (6):2026-2034, 1991.

ERKLÄRUNG

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen-, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie - abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen - noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Reinhard Krämer betreut worden.

Ich versichere, dass ich alle Angaben wahrheitsgemäß nach bestem Wissen und Gewissen gemacht habe und verpflichte mich, jedmögliche, die obigen Angaben betreffende Veränderung, dem Dekanat unverzüglich mitzuteilen.

Keine Teilpublikationen

LEBENS LAUF

- 18.01.1973 geboren in Berlin-Schmargendorf
- 1979-1983 Besuch der Clemens-Brentano Grundschule in Berlin-Lichterfelde
- 1983-1985 Besuch der Orientierungsstufe Wallstrasse in Wolfenbüttel
- 1985-1992 Besuch des Gymnasiums Grosse Schule in Wolfenbüttel,
Abschluss mit der Allgemeinen Hochschulreife
- 1992-1994 Studium der Biologie an der Universität Rostock
- 1994-1998 Studium der Biologie an der Universität zu Köln,
Abschluss mit dem akademischen Grad Diplom-Biologin
Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biochemie der Deutschen
Sporthochschule Köln in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Schänzer
- 1999-2002 Doktorarbeit im Institut für Biochemie der Universität zu Köln, in der
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. R. Krämer
Thema: Biochemische Charakterisierung vakuolärer Vesikel aus
Saccharomyces cerevisiae

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Universität zu Köln angefertigt.

Herrn Professor Dr. Reinhard Krämer danke ich für die Überlassung des Themas, die freundliche und engagierte Betreuung sowie für die hilfreichen Diskussionen und Anregungen.

Rolf danke ich für den Teil der Kritik, der angebracht war und Anne, Maike, Markus, sowie allen anderen Kollegen und Frau Benova für das gute Klima; bei Diana und Mathias bedanke ich mich für den theoretischen und praktischen Zugang zur Massenspektrometrie.

Mein besonderer Dank gilt Gabi Sitek, die mir in jeder Lebenslage beigestanden hat und natürlich den Liebsten, Ute und Betina.